

TARTU ÜLIKOOL
LOODUS- JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT
GENEETIKA ÕPPETOOL

Karl Jürgenstein

Translatsiooni täpsus tRNA antikoodonlingu Ψ 32 ja Ψ 38-40 puudumisel

Magistritöö

30 EAP

Juhendajad MSc Mari Tagel

PhD Heili Ilves

TARTU 2019

Infoleht

Translatsiooni täpsus tRNA antikoodonlingu Ψ 32 ja Ψ 38-40 puudumisel

Pseudouridiinid (Ψ) on laialt levinud posttranskriptsioonilised modifikatsioonid RNA-s, mis esinevad kõigis eludomeenides. Kuigi põhjalikult uuritud, puudub seletus pseudouridiinide konserveerumisel ning levikul. Ψ -süntaasid TruA ja RluA isomeriseerivad uridiine bakterite tRNA antikoodonlingus. Laboritingimustes pole kumbki ensüüm bakterile eluks vajalik, aga varasemalt on näidatud seos tRNA antikoodonlingu modifikatsioonide ning translatsiooni täpsuse vahel. Käesolevas töös on võrreldud translatsiooni täpsust bakterites *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas aeruginosa* ja *Escherichia coli*. Samuti on näidatud, et TruA, aga mitte RluA, puudumine mõjutab translatsiooni täpsust neis bakterites.

Märksõnad: translatsiooni täpsus, pseudouridiin, TruA, RluA

CERCS: B230 Mikrobioloogia, bakterioloogia, viroloogia, mükoloogia

Translational fidelity in the absence of Ψ 32 and Ψ 38-40 in the tRNA anticodon stem-loop

Pseudouridines (Ψ) are common RNA posttranscriptional modifications found in all domains of life. Although extensive research has been done, no clear reasoning exists to explain the conserved and widespread nature of pseudouridines. Ψ -synthases TruA and RluA modify uridine residues in the anticodon stem-loop of tRNA. Although both non-essential in laboratory conditions a link has been established between the RNA modifications in the anticodon stem-loop and translational fidelity. The thesis at hand compares the translational fidelity in bacteria *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli*. The present work also shows that the lack of TruA, but not RluA, affects translational fidelity in aforementioned bacteria.

Keywords: translational fidelity, pseudouridine, TruA, RluA

CERCS: B230 Microbiology, bacteriology, virology, mycology

Sisukord

Infoleht	2
Kasutatud lühendid	5
Sissejuhatus	6
1. Kirjanduse ülevaade	7
1.1 Täpsus valgusünteesil	7
1.1.1 Vead aminoatsüleerimisel	7
1.1.2 Vead dekodeerimisel	9
1.1.3 Translatsiooni täpsuse mõõtmine	12
1.2 Translatsioonivigade tagajärjed	13
1.3 RNA modifikatsioonid	15
1.3.1 Pseudouridiinid	15
1.3.2 Pseudouridiini süntaas TruA	17
1.3.3 Pseudouridiini süntaas RluA	19
2. Eksperimentaalne osa	21
2.1 Töö eesmärgid	21
2.2 Materjal ja meetodika	22
2.2.1 Kasutatud söötmed, bakteritüved ja plasmiidid	22
2.2.2 Kompetentsete rakkude valmistamine ja DNA viimine rakkudesse	22
2.2.3 Polümeraasi ahelreaktsioon (PCR)	23
2.2.4 Kloonimine	24
2.2.5 Gelelektroforees	24
2.2.6 <i>lacZ</i> testsüsteemiga translatsiooni täpsuse mõõtmine	25
2.2.7 Plasmidi stabiilsuse kontroll	25
2.2.8 Topeltlutsiferaasi testsüsteemiga translatsiooni täpsuse mõõtmine	25
2.2.9 Minimaalse inhibeeriva kontsentratsiooni (MIC) määramine	27
2.2.10 <i>P. putida</i> tüvede kasvukõverate mõõtmine	27

2.2.11	Statistiline analüüs	27
2.3	Tulemused	28
2.3.1	Translatsiooni täpsuse mõõtmine <i>lacZ</i> reportergeenil põhineva testsüsteemiga bakterites <i>Pseudomonas putida</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ja <i>Escherichia coli</i>	28
2.3.2	Translatsiooni täpsuse mõõtmine topeltlutsiferaasi testsüsteemiga bakterites <i>Pseudomonas putida</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ja <i>Escherichia coli</i> ..	29
2.3.3	Ψ32 ning Ψ38-40 mõju translatsiooni täpsusele.....	31
2.3.4	Pseudouridiini süntaasi TruA efekt tuleneb katalüütilisest aktiivsusest...	34
2.3.5	Streptomütsiini mõju translatsiooni täpsusele <i>P. putida</i> -s.....	35
3.	Arutelu	38
3.1	Valgusünteesi täpsus erinevates bakteriliikides	38
3.2	Ψ32, Ψ38-40 mõju valgusünteesi täpsusele	40
	Kokkuvõte	43
	Summary.....	44
	Tänuõnad.....	45
	Kasutatud kirjandus	46
	Kasutatud veebilehed.....	51
	Lisad	52

Kasutatud lühendid

aaRS – aminohappe-tRNA süntetaas

FS – raaminihe (ingl k – *frameshift*)

PTC – peptidüültransferaasne tsenter

ROS – reaktiivsed hapnikuühendid (ingl k – *reactive oxygen species*)

Ψ – pseudouridiin

wt – metsiktüvi (ingl k – *wild-type*)

Sissejuhatus

Elusrakkudes on valkude aminohappelise järjestuse geneetiline info pandud paika DNA-s, millelt transkribeeritud mRNA-lt transleeritakse ribosoomis polüpeptiid. Polüpeptiidi aminohappeline järjestus määrab valgu struktuuri ning funktsiooni. Translatsiooni masinavärgi ülesandeks on säilitada piisavalt kiire ning täpne valgusüntees, et tagada raku elutegevus. Valgusünteesil toimuvad vead võivad muuta sünteesitava polüpeptiidi mittefunktsionaalseks või koguni rakule kahjulikuks. Valgusünteesi mehhanism on keerukas ning hõlmab endas palju väiksemaid protsesse, seega satuvad valed aminohapped juhuslikult ikkagi valkudesse.

Translatsiooni täpsust on varasemalt põhjalikult uuritud, jälgides erinevat tüüpi translatsioonivigade esinemist. Uuringud on tavaliselt viidud läbi ühes organismis, mis ei anna ülevaadet ega võimalda võrrelda translatsiooni täpsuse profiili erinevust eri liikide vahel.

Translatsioonil osaleb mitut tüüpi RNA molekule: ribosoom koosneb rRNA-st ning mRNA-lt toimub koodonite põhjal polüpeptiidi ehitamine tRNA-de abil. Mitme RNA funktsioonide juures mängivad olulist rolli posttranskriptsioonilised modifikatsioonid. Neist levinuim, pseudouridiin (Ψ), esineb RNA-de funktsionaalselt olulistest piirkondades, kuid selle täpne funktsioon on ebaselge.

Meie laboris avastati, et bakteris *Pseudomonas putida* tõuseb mutatsioonisagedus Ψ -süntaaside TruA ning RluA puudumisel. Sarnast efekti täheldati ka bakteris *Pseudomonas aeruginosa*. TruA ja RluA sünteesivad pseudouridiini tRNA antikoodonlingus, mistõttu tekkis hüpotees, et nende pseudouridiinide funktsiooniks võib olla translatsiooni täpsuse säilitamine ning nähtud mutatsioonisageduse tõus Ψ -de puudumisel on põhjustatud translatsiooni täpsuse muutumisest.

Eelnevast lähtudes on käesoleva töö eesmärgiks leida testsüsteem, mis võimaldaks kirjeldada ja võrrelda translatsiooni täpsust bakterites *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas aeruginosa* ja *Escherichia coli* ning iseloomustada selle testsüsteemi abil TruA ja RluA puudumise mõju translatsiooni täpsusele neis bakterites.

1. Kirjanduse ülevaade

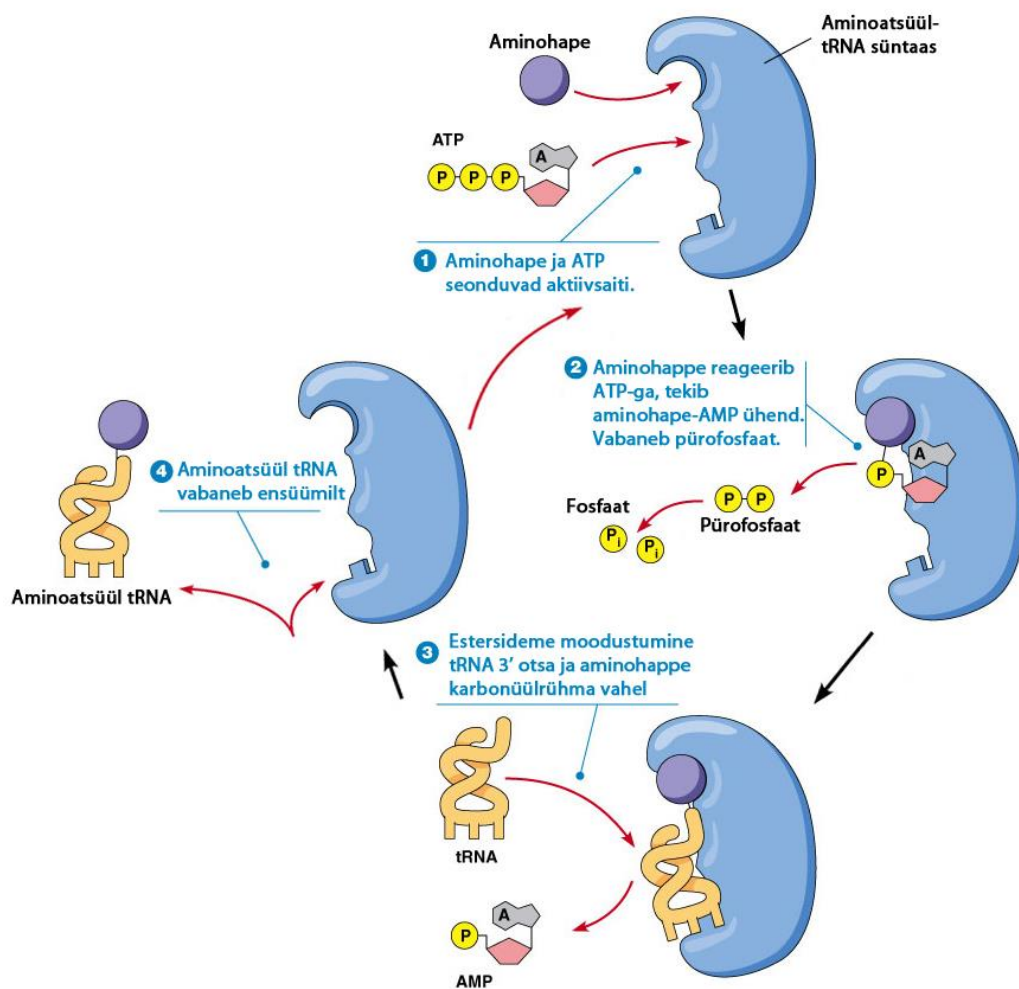
1.1 Täpsus valgusünteesil

Organismi kohasus oleneb geneetilise info avaldumise täpsusest. Seda täpsust langetavaid vigu esineb muidugi nii replikatsioonil kui ka transkriptsioonil ent kõige suurema sagedusega toimuvad vead bioloogilise info edasikandumise viimases etapis ehk translatsioonil. Bioloogiliselt on see ka mõistetav: vead replikatsioonil võivad viia mutatsioonideni DNA-s, olles pärilikud ning seetõttu ulatusliku ja püsiva mõjuga. Tänu paljudele vigu parandavatele süsteemidele on näidatud, et prokariootides lisatakse replikatsioonil 1 vale nukleotiid 10^8 nukleotiidi kohta (Kunkel, 2004). Vead transkriptsioonil (sagedusega ~ 1 viga 10^5 nukleotiidi kohta) ja translatsioonil (sagedusega ~ 1 viga 10^4 aminohappe kohta) on ajutist laadi, mõjutades vaid konkreetselt vigaselt transkribeeritud mRNA-lt transleeritud valke või vaid seda valku, mille translatsioonil viga on tehtud (Ellis ja Gallant, 1982, Imashimizu jt., 2013). Valgusünteesi kiirus ja täpsus on omavahel vastandlikus suhtes, emb-kumb saab suurenda vaid teise arvelt. Ribosoom on saavutanud nende parameetrite vahel kompromissi: valgusüntees on piisavalt kiire, et võimaldada organismi kasvuks vajalike valkude hulk, säilitades samal ajal piisava täpsuse, et proteoomis esinevad vead ei muutuks organismile kahjulikuks (Johansson jt., 2012).

Vead translatsioonil võib tekkemehhanismi järgi jagada kaheks: 1) vead tRNA aminoatsetüleerimisel, mille tulemuseks on ebakorrektselt paardunud aminohape ja tRNA; 2) vead dekodeerimisel ribosoomis ehk sündmused, mille puhul teeb ribosoom vigu mRNA-l koodonite lugemisel. Mõlema mehhanismi korral on tegemist mitmeetapiliste protsessidega, mistõttu on vigade tekkeks palju võimalusi. Arvukad kontrollmehhanismid võimaldavad siiski translatsioonitäpsust säilitada.

1.1.1 Vead aminoatsüleerimisel

Täpse translatsiooni masinavärgi eelduseks on korrektselt laetud ehk õiget aminohapet kandvate tRNA-de esinemine rakus. See tähendab, et näiteks aminohappe lüsiin koodonitele vastavaid antikoodoneid sisaldavad tRNA-d on laetud just nimelt lüsiiniga. Aminoatsüül-tRNA süntaasid (aaRS-d) on ensüümid, mis katalüüsivad aminoatsüleerimisreaktsiooni, mille käigus liidetakse aminohape vastava tRNA molekuli külge (joonis 1). Selle reaktsiooni esimeses etapis toimub aminohappe aktiveerimine ATP abil: ensüümi spetsiifilisse taskusse seondunud aminohappele liidetakse ATP-st saadud AMP, tekib aminohape-AMP ühend, vabaneb PP_i (joonis 1 punktid 1-2). Teises etapis sünteesitakse esterside aktiveeritud aminohappe ja aaRS-i vastavasse taskusse seondunud tRNA 3' otsa vahel, AMP vabaneb aminohappe küljest, ning aminohappega laetud tRNA vabaneb aaRS-lt (joonis 1 punktid 3-4) (Pang jt., 2014).



Joonis 1. Aminoatsüleerimise etapid: aminohappe aktiveerimine (punktid 1-2) ning laadimine tRNA-le (3-4). (Muudetud, https://www.mun.ca/biology/desmid/brian/BIOL2060/BIOL2060-22/22_05.jpg)

Kõigis rakkudes esineb aminohappeid ja muid keemilisi ühendeid, mis võivad struktuurilt küll sarnaneda standardsetele aminohapetele, kuid mis ei ole ette nähtud translatsioonil polüpeptiidi sünteesiks. Neid nimetatakse mitte-proteinogeenseteks aminohapeteks ning nende hulka kuuluvad näiteks aminohapete D-isomeerid (valgu biosünteesil liidetakse polüpeptiidi vaid L-isomeere), proteinogeensete aminohapete biosünteesi vahevormid (homotsüsteiin) või hapnikuradikaalide ehk ROS-ide (ingl k – *reactive oxygen species*) kahjustatud standardsed aminohapped (Jakubowski, 1990, Bullwinkle jt., 2014, Gao jt., 2015). Seega peab aaRS tegema õige valiku 20 proteinogeense ning paljude mitte-proteinogeensete aminohapete hulgast. Aminohappe selektsioonil eristatakse võimalike substraate peamiselt suuruse ning füüsikalise-keemiliste omaduste poolest, kuid siiski on näidatud, et selline valik ei ole lõpuni diskreetne, sest aminohapped on küllaltki väikesed molekulid, millel interakteeruvaid rühmasid on vähe. Näiteksalaniini-tRNA süntaasil (alaRS) on raskusialaniini eristamisega seriinist (erinevuseks üks hüdroksüülrühm) ning glütsiinist (erinevuseks üks metüülrühm) (Guo jt., 2009). Vigade sagedus aminohappe valikul varieerub

erinevate aaRS-de vahel, näiteks *E. coli* lüsiini-tRNA süntaasil on enim raskusi lüsiini ja arginiini eristamisel, liites lüsiini tRNA-le arginiini sagedusega 1:1600 (Jakubowski, 1999). Samas on näidatud, et tsüsteiini-tRNA süntaas, mis võib vale aminohappena kõige sagedamini validaalaniini, teeb seda vaid sagedusega $1:2 \times 10^7$ (Fersht ja Dingwall, 1979).

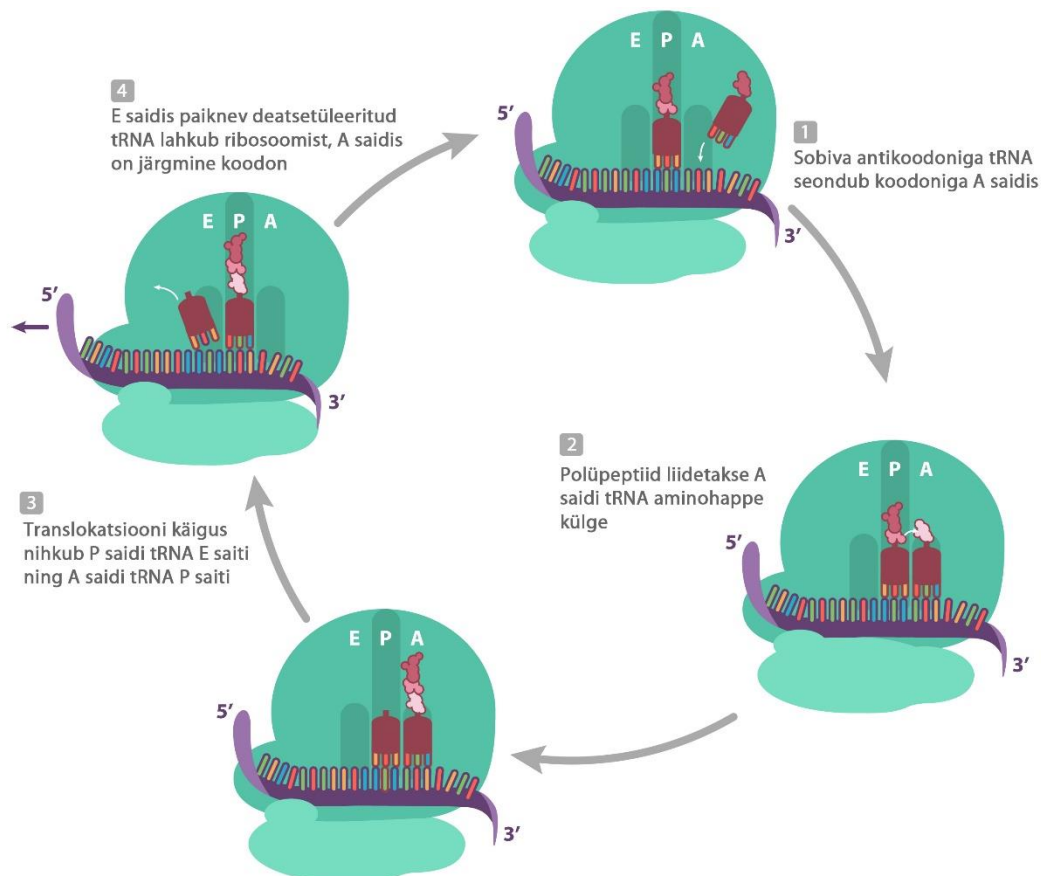
AaRS-d on ühe aminohappe, kuid mitte ühe tRNA spetsiifilised, sest ühte aminohapet kodeerivaid koodoneid võib olla mitu. Sama aminohappe erinevate koodonitele vastavate antikoodonitega tRNA-sid nimetatakse isoaktseptoorseteks tRNA-deks. Variatsioon tRNA-de vahel on väga suur, sest lisaks nukleotiidsele järjestusele ning erinevatele struktuurilelementidele, erinevad tRNA-d üksteisest ka arvukate post-transkriptsiooniliste modifikatsioonide poolest. On näidatud, et modifikatsioonide muster võib stressitingimuste tagajärjel muutuda, mis suurendab tRNA-de varieeruvust veelgi (Gu jt., 2014). Seega on aaRS-d keerulise ülesande ees: rakus olevate laadimata tRNA-de hulgast tuleb välja valida vastavale aminohappele mõeldud tRNA, kuid siiski peab selektsioonil olema lubatud piisavalt varieeruvust, et võimaldada erinevate isoaktseptor tRNA-de sidumine. See on oluline translatsiooni efektiivsuse jaoks, sest sellisel juhul on rakus erinevad isoaktseptor tRNA-d aminohapetega laetud ning alternatiivsete koodonite esinemine ei häiri oluliselt valgusünteesi (Mohler ja Ibba, 2017).

Translatsioonitäpsust aitavad neis protsessides hoida kontrollmehhanismid, mis võivad rakenduda enne kui aminohape tRNA-le edasi kandub (ülekande-eelne e. *pre-transfer editing*) või kui aminohappe ülekanne tRNA-le on toimunud (ülekandejärgne e. *post-transfer editing*). Ülekande-eelsel kontrollil vabaneb vale aminohape juba enne aktiveerimist aaRS-i aminohapet siduvast aktiivsaidist vähenenud seondumisafiinsuse tõttu või hüdrolüüsitakse ensümaatilisel valesti seondunud aktiveeritud aminohape. Aminohappe ülekandejärgsel kontrollil hüdrolüüsivad valesti loodud sidet aminohappe ning tRNA vahel nii aaRS-d ise kui ka spetsiaalsed eraldiseisvad ensüümid, takistades seeläbi valesti laetud tRNA sattumist ribosoomi (Das jt., 2013). Elongatsioonifaktor EF-Tu, mis vastutab laetud tRNA ribosoomi A saiti sattumise eest bakterites, seob valesti laetud tRNA-sid liiga tugevalt, pärssides seeläbi translatsiooni elongatsiooni ribosoomis, või nõrgalt, vähendades võimalust valesti laetud tRNA-l ribosoomi A saiti sattuda (Martinis ja Boniecki, 2010).

1.1.2 Vead dekodeerimisel

Aminohapetest polüpeptiidi ehitamine leiab aset ribosoomis. Prokariootne ribosoom (70S) koosneb rRNA-st ja valkudest ning moodustub kahest subühikust: väike (30S) subühik ja suur (50S) subühik. Väike subühik sisaldab ribosoomi dekodeerimistsentrit, kus translatsiooni elongatsioonil toimub aminohapetega laetud tRNA antikoodoni ja mRNA

koodoni komplementaarsuse kontroll. Ribosoomi suures subühikus paikneb peptidüültransferaasne tseenter (PTC), kus sünteesitakse kasvava polüpeptiidahela ja uue aminohappe vahele peptiidside. Ribosoomis on tRNA-l võimalik paikneda kolmes saidis: 1) A sait, kuhu toimub EF-Tu-ga seotud aminoatsüül-tRNA sisenemine ning dekodeerimistsentris antikoodon-koodon kontroll; 2) P sait, kuhu translokeerub tRNA A saidist pärast peptiidahela ülekannet peptidüül-tRNA-lt (peptiidahelat kandev tRNA); 3) E sait, kuhu pärast peptiidahela ülekannet järgmisele tRNA-le liigub deatsetüleeritud tRNA, mis seejärel väljub ribosoomist (joonis 2) (Ramakrishnan, 2002).



Joonis 2. tRNA paiknemine ribosoomis translatiooni elongatsiooni käigus. Rohelisega on tähistatud ribosoom, lillaga mRNA ning tumepunasega tRNA-d. E, P, A vastavad tRNA paiknemissaitidele. (Muudetud, <https://cdn.kastatic.org/ka-perseus-images/b526aaa21fea30cc9e3b1cb7da6d5ea6ee6520b3.png>)

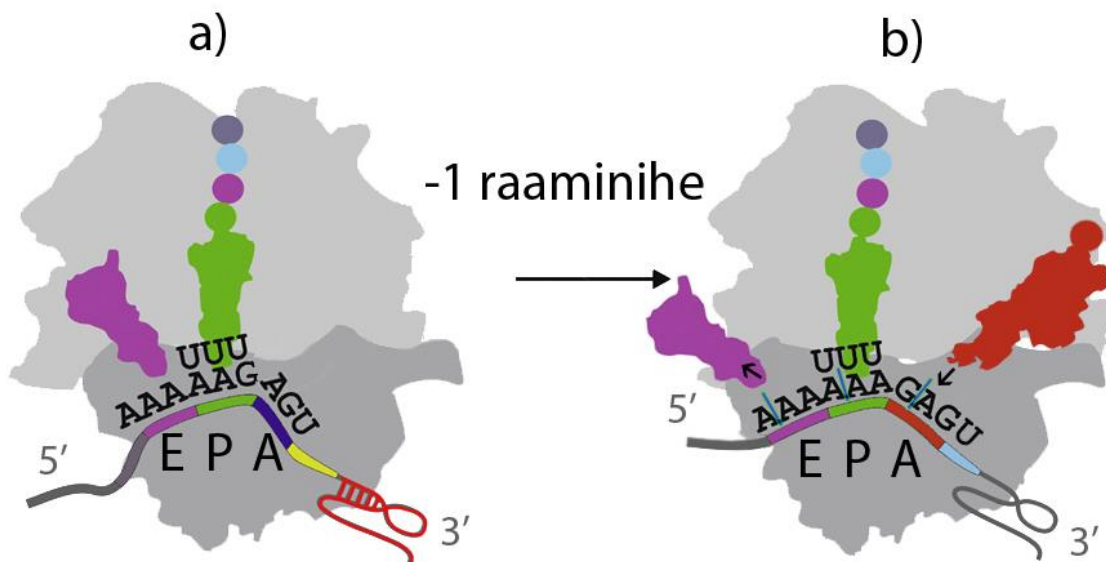
Ribosoomi subühikud ise ei ole võimelised kontrollima, kas elongatsioonil osalev tRNA on laetud õige aminohappega (Reynolds jt., 2010). Ribosoomi dekodeermistsentris kontrollitakse, kas A saiti sattunud tRNA antikoodon on komplementaarne mRNA-l leiduva koodoniga. Dekodeerimise käigus jälgivad tekkiva antikoodon-koodon aluspaaride heeliksi geometriat väga täpselt nukleotiidid rRNA-l, kutsudes õige paardumise korral esile ribosoomi struktuurimuutuse, mis laseb polüpeptiidi elongatsioonil jätkuda (Demeshkina jt., 2012). See süsteem on väga tundlik mRNA koodoni 1. ja 2. postisiooni aluspaaride suhtes, nõudes neis

positsioonides kanoonilist Watson-Crick tüüpi paardumist. 3. positsioonis on lubatud nn *wobble*-paardumine, ehk seal võib esineda ka muud tüüpi kui Watson-Crick paardumine (Agris jt., 2018). *Wobble*-i bioloogiline tähtsus seisneb selles, et enamikes organismides ei ole tervet komplekti tRNA-sid ehk kõikide geneetilises koodis esinevatele koodonitele vastavate antikoodonitega tRNA-sid. *Wobble* aitab vältida olukorda, kus valgusüntees aeglustub või peatub, sest A saidis olevale mRNA koodonile komplementaarset antikoodoniga tRNA-d on rakus vähe või pole üldse. On näidatud, et kuigi inimese genoomis on tRNA geene üle 600, on 15 antikoodonit nende tRNA-de hulgas esindamata. Siiski võib *wobble* viia valede aminohapete polüpeptiidi lisamiseni (Chan ja Lowe, 2015, Ou jt., 2019). Samuti on näidatud, et *wobble* on üks stoppkoodonite ülelugemise põhjustest ehk nähtus, kus translatsioon ei peatu stoppkoodonini jõudes, translatsiooni terminatsiooni ei toimu ning polüpeptiidi süntees jätkub. Ülelugemise puhul ei tunne A saiti sattunud stoppkoodonit ära vabanemistfaktorid (RF1 ja RF2 prokariootides, eRF1 eukariootides) vaid tRNA, mis *wobble*-paardub stoppkoodoniga (Bertram jt., 2001).

Dekodeerimisel liigub ribosoom mRNA-l rangelt lugemisraami jälgides ehk liigub edasi 3 nukleotiidsete sammude kaupa. Lugemisraami paneb paika startkoodon, translatsiooni elongatsiooni käigus tekkivaid kõrvalekaldeid sellest lugemisraamist nimetatakse ribosomaalseteks või translatsioonilisteks raaminiheteks. Oluline on siinkohal neid eristada raaminihke mutatsioonidest, mis on nukleotiidide insertioonid või deletsioonid DNA-s ja mille korral rikutakse geeni lugemisraam juba DNA tasemel. Raaminihke mutatsioonide mõju geeniekspressioonile on ulatuslikum ning püsivam, translatsiooniline raaminihe mõjutab vaid valke, mille sünteesil viga on tehtud (Farabaugh, 2000).

Ühe aminohappe valesti liitmine ei pruugi veel valgu funktsiooni häirida, sest geneetilise koodi ülesehitus on selline, et suure tõenäosusega toimub asendus keemiliste omaduste poolest sarnase aminohappega (Farabaugh, 2000). Siiski on valgud väga tundlikud aktiivtsentrites toimuvate aminohappelist muutuste suhtes. Raaminihke sündmused on elutegevuse kohalt ohtlikumad, kuna siis sünteesitakse polüpeptiid, mille aminohappeline järjestus on suures ulatuses vale. Näiteks *E. coli*-s on nn „raamist-väljas“ stoppkoodoneid keskmiselt iga 20 koodoni järel ehk raaminihke korral on väga tõenäoline, et tekivad lühikesed mitte-funktsionaalsed ja suvalise aminohappelise järjestusega polüpeptiidid. Need võivad olla rakule lihtsalt kulukad energia ja ressursside mõttes, kuid võivad olla ka toksilise toimega, näiteks põhjustada teiste valkude valesti voltumist või muul moel valkude või membraanidega interakteerudes neid kahjustada (Kurland, 1992).

Raaminihete uurimisel on lähtutud programmeeritud raaminihetest, kus translatsioonilist raaminihke toimumist stimuleerivad erinevad mRNA-s esinevad elemendid (Farabaugh, 1996). Üldise raaminihke mudeli kohaselt toimub raaminihe kui ribosoom mRNA-l aeglustub. Tavaliselt põhjustavad seda mRNA sekundaarstruktuurid või koodonid, millele vastavat tRNA-d on rakus vähe. Ribosoomi aeglustumisel võib P saidis olev tRNA oma koodonilt ajutiselt dissotsieeruda ilma P saidist lahkumata ning paarduda uuesti algsest lugemisraamist väljas oleva koodoniga, liikudes tavaliselt 1 nukleotiidi võrra mRNA-l edasi 3' otsa poole (+ raaminihe) või tagasi 5' otsa poole (– raaminihe) (joonis 3). Raaminihke toimumist täheldatakse enim „libiseval järjestusel“, kus algse koodoniga alternatiivses raamis on koodon, millega algse tRNA antikoodon saab paarduda, „libisedes“ mRNA-l edasi või tagasi. P saidis toimunud ümberkorralduse tagajärjel muutub ka A saidis olev koodon ning elongatsioon jätkub uues lugemisraamis (Baranov jt., 2004).



Joonis 3. Raaminihke mudel: a) Punasega märgitud mRNA sekundaarstruktuuri tõttu aeglustub elongatsioon b) P saidis olev tRNA on oma algse koodonilt dissotsieerunud ning uuesti seondunud koodoniga 1 nukleotiidi võrra 5' otsa pool. Selle tagajärjel on A saidis olev koodon muutunud. Püstised sinised kriipsud tähistavad algset lugemisraami (Muudetud, Caliskan jt. 2017).

1.1.3 Translatsiooni täpsuse mõõtmine

Translatsiooni täpsuse mõõtmisel kasutatakse erinevaid meetodeid, aga üldiselt põhinevad need mutatsioone sisaldava reportergeeni produkti funktsionaalsuse taastumisel tänu translatsiooni ebatäpsusele. Translatsiooni täpsuse mõõtmiseks sobivad reportergeenid, mis on detekteeritavad juba madala ekspressioonitaseme korral. Reportergeeni DNA-sse on disainitud mutatsioon, mille tagajärjel geenilt transleeritav valk ei ole funktsionaalne. Mutatsioon võib olla näiteks enneaegne stoppkoodon, nukleotiidide insertioon/deletsioon või asendamine.

Valgu aktiivsus on võimalik juhul, kui disainitud mutatsiooni efekti nullib translatsiooni ebatäpsus, näiteks toimub stoppkoodoni ülelugemine või raaminihe insertioonide/deletsioonide korral, mille käigus taastub algne lugemisraam (Weiss jt., 1987, Grentzmann jt., 1998, Meyerovich jt., 2010, Gomes jt., 2016).

Esimene kirjeldatud meetod kasutas reporterina *lacZ* geeni, mis kodeerib ensüümi β -galaktosidaasi. See on suuteline hüdrofüüsima galaktoosi ja mingi muu ühendi vahel paiknevat glükosiidset sidet. ONPG (orto-nitrofenüül- β -D-galaktopüranosiid) on sünteetiline ühend, mis β -galaktosidaasi toimele lagundatakse galaktoosiks ning orto-nitrofenooliks. Viimase tekkimist on võimalik kvantiteerida tänu selle kollasele värvusele. Võrreldes mutatsiooniga ning mutatsioonita *lacZ* geeni kandvate rakkude β -galaktoosi aktiivsust on võimalik määrata vastava translatsioonivea tekkimise sagedus (Weiss jt., 1987).

Topeltlutsiferaasi testsüsteemis on samas operonis kaks järjestikust lutsiferaasi geeni: *Renilla reniformis* lutsiferaas (*rluc*) ning jaanimardiklase *Photinus pyralis* lutsiferaas (*fluc*). Translatsioonil moodustub neist bifunktsionaalne liitvalk. Operoni tagumise geeni (*fluc*) translatsioon toimub jätkuna esimese geeni (*rluc*) translatsioonile. Kahe geeni vahelisse *linker*-alasse on viidud mutatsioonid sisse nii, et operoni tagumiselt geenilt (*fluc*) sünteesitakse funktsionaalne produkt vaid mutatsiooni efekti nulliva translatsioonivea tagajärjel. Kummagi lutsiferaasi aktiivsust on võimalik tänu nende erinevatele substraatidele eraldi mõõta. Leides Fluc lutsiferaasi väärtuse suhte Rluc väärtuse vastu, on võimalik määrata uuritud translatsioonivea toimumise sagedus. Topeltlutsiferaasi testsüsteemi eeliseks on, et tänu väga tundlikele reporteritele ja operonisisesele kontrollile on tulemused väga täpsed ning ei vaja katses rakkude arvukuse määramist (Grentzmann jt., 1998).

Lisaks eelpool mainitutele on translatsiooni täpsuse uurimiseks olemas veel nii ühel kui ka kahel reporteril põhinevaid testsüsteeme, mis kasutavad reporteritena fluorestseeruvaid valke (Meyerovich jt., 2010, Gomes jt., 2016). Samuti on kirjeldatud meetodit, kus translatsioonivigu määratakse valguspetsiifiliselt suunatud mass-spektromeetria abil (Garofalo jt., 2019).

1.2 Translatsioonivigade tagajärjed

Valgusünteesi täpsuse langusest tingitud mõju fenotüübile on täheldatud nii pro- kui ka eukariootides. 2006. aastal uurisid Lee jt., hiirtes spontaanselt tekkinud neurodegeneratiivsete ilmingute põhjuseid. Leiti, et aju Purkinje rakkudes oli suurenenud apoptootiliste markerite tase ning täheldati nende rakkude taandarengut ning kadu. Metsiktüüp hiirtega võrreldes leiti haigete hiirte genoomis mutatsioon alaniini-tRNA süntaasi geenis. Mutatsiooni tagajärjel

väheneb süntaasi ülekandjärgne kontroll, ning rakkudes suureneb seriiniga laetudalaniini-tRNA hulk, mis omakorda viis seriini juhusliku sisestamisenialaniini asemel valkudesse. Uuritud rakkudes täheldati valesti voltunud valkude kuhjumist ning valkude agregeerumist, mis toodi ka tekkinud sümptomite põhjuseks (Lee jt., 2006). Valede aminohapete polüpeptiidi lisandumise kahjulikku mõju on ka näidatud bakterites, kus jälgiti ülekandjärgse kontrolli suhtes defektse isoleutsiin-tRNA süntaasi mõju vananevates bakterikultuurides. Translatsioonitäpsuse langedes suureneb valede aminohapete arv proteoomis, mis tähendas ka vigu DNA replikatsiooni ning reparatsiooniga seotud valkudes, mis omakorda viis mutatsioonide kuhjumiseni genoomis, kui nende valkude funktsioon oli häiritud (Bacher ja Schimmel, 2007).

Kuigi vead translatsioonil reeglina häirivad raku normaalset elutegevust, on tõendeid selle kohta, et teatud tingimustes võib translatsioonivigadel olla kasulik roll. On kirjeldatud keskkonna stressiga kohanemise mehhanisme, mis põhinevad translatsiooni ebatäpsusel. Näiteks on imetajarakkudes näidatud, et ROS-ist põhjustatud stressi korral aktiveeritakse kinaas ERK, mis fosforüleerib metioniini-tRNA süntaasi. Selle tagajärjel suureneb süntaasi ebaspetsiifilisus tRNA valikul. Tulemuseks on metioniiniga laetud erinevad tRNA-d ning metioniini esindatuse kasv proteoomis. Metioniini jäägid käituvad valkudes antioksidantidena: olles ise sihtmärgiks ROS-idele väheneb kahjulik mõju ülejäänud proteoomile. Hapnikuradikaalide oksüdeeritud metioniin redutseeritakse ensümaatilisel tagasi metioniiniks (Lee jt., 2014). Sarnaseid mehhanisme on kirjeldatud ka bakterites ning arhedes (Schwartz jt., 2016).

Paljudel viirustel on translatsiooniline raaminihe vajalik viiruse valkude tootmisel. Esimesena kirjeldati seda Rousi sarkoomiviirusel (RSV), kus viiruse genoomis kaks geeni osaliselt kattuvad. Need geenid on *gag*, mis kodeerib viiruse kapsiidivalke ning *pol*, mis kodeerib pöördtranskriptaasi. Pöördtranskriptaasi sünteesiks on vajalik raaminihke toimumine enne *gag* stoppkoodonit, mille tulemusena sünteesitakse *gag-pol* liitvalk. Raaminihe toimub spetsiifilises kohas sekundaarstruktuuri moodustava RNA lõigu ees „libiseval järjestusel“, hinnanguliselt umbes 5% juhtudest *gag* translatsioonil. Selline sagedus tagab viiruse jaoks õiges vahekorras struktuursete kapsiidivalkude (mida on rohkem vaja) ja ensümaatiliste polümeraaside (mida nii palju vaja ei ole) hulga ilma, et mõlemad geenid peaksid olema eraldi reguleeritud. See võimaldab viirusel hakkama saada väiksema genoomiga, mis on energaetiliselt ja ruumiliselt efektiivsem (Jacks jt., 1988). Kuigi programmeeritud raaminihke sündmuseid on peamiselt leitud viirustel, on sarnast mehhanismi kirjeldatud ka näiteks *E. coli* geenil *dnaX*, millelt kodeeritakse DNA III polümeraasi γ ja τ subühikud. τ subühik

transleeritakse ühes lugemisraamis tervelt geenilt, kuid γ subühiku sünteesiks peab translatsioonil toimuma raaminihe mRNA 3' suunal (– raaminihe) ning seejärel uues lugemisraamis stoppkoodonil terminatsioon. Sarnaselt viirustele on ka *dnaX* geeni mRNA-s leitud raaminihet soodustavaid elemente (Tsuchihashi, 1991).

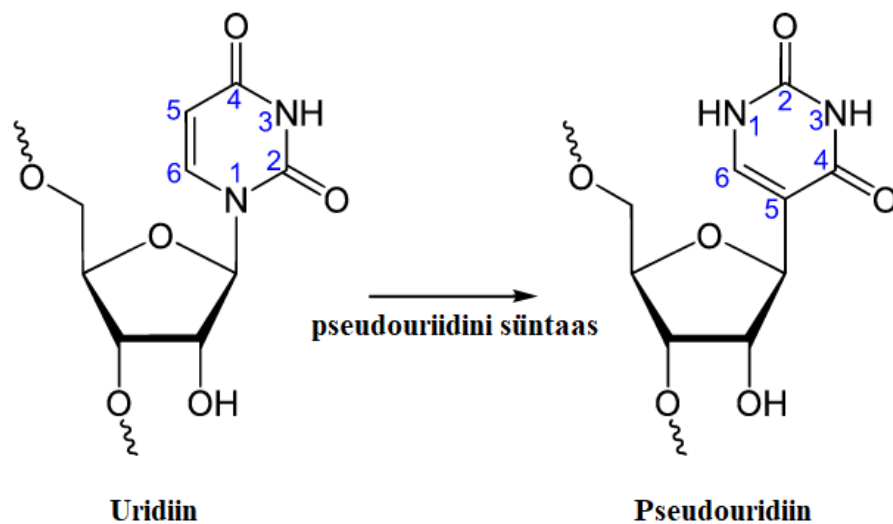
1.3 RNA modifikatsioonid

RNA-l on translatsioonis keskne roll. Ribosoomis, mis ise koosneb osaliselt rRNA-st, toimub mRNA pealt polüpeptiidi süntees, mille aminohapetest ehituskivid toovad kohale tRNA-d.

RNA klassikalist ribonukleotiidset tähestikku (A, U, G, C) laiendavad arvukad võimalikud post-transkriptsioonilised modifikatsioonid, mida tänaseks on kirjeldatud rohkem kui 150 erinevat (Boccalletto jt., 2017). Need modifikatsioonid muudavad mitmekesisemaks nukleotiidide võimekust interakteeruda teiste molekulidega ning seeläbi võimaldavad RNA-l täita väga erinevaid ülesandeid (Lewis jt., 2017). Kuigi levinud laialt kõigis eludomeenides, on paljude RNA modifikatsioonide täpne funktsioon teadmata (Yi ja Pan, 2011). Siiski võib eeldada nende olulist rolli valgusünteesil: nii rRNA-s kui ka tRNA-s esineb konserveerunud modifikatsioone ning tRNA-d on enim modifitseeritud nukleiinhappe molekulid rakkudes (Ofengand ja Bakin, 1997, Kirchner ja Ignatova, 2015).

1.3.1 Pseudouridiinid

Pseudouridiinid (Ψ) ehk 5-ribosüül-uratsiilid on RNA-des enim leiduvad modifikatsioonid. Ajalooliselt oli tegemist ka esimese RNA-st avastatud modifikatsiooniga. Kui uridiinis on lämmastikaluse ning suhkrujäägi vahel N-C glükosiidne side, siis pseudouridiinis on uratsiil suhkrujäägiga seotud C-C glükosiidse sideme kaudu. Selline side on paindlikum, võimaldades pseudouridiinil suuremat konformatsioonilist vabadust. Samuti on pseudouridiinil vaba N1-H, mille kaudu saab moodustada lisa vesiniksidet ja seeläbi RNA struktuuri stabiliseerida (joonis 4) (Charette ja Gray, 2000).



Joonis 4. Uridiini ja pseudouridiini võrdlus. Lainelised jooned viitavad, et nukleotiid paikneb RNA ahelas. (Muudetud, https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/4/4a/Synthesis_of_Pseudouridine.svg)

Pseudouridiini leidub kõigis tRNA-des, esinedes tRNA D-lingus ning antikoodon lingus kõigis eludomeenides. Kõige konserveerunum on positsioon $\Psi 55$ T-lingus, mille järgi tuntakse seda ka T Ψ C-linguna. Pseudouridiin aitab neis positsioonides stabiliseerida seda tRNA struktuurimotiivi, milles ta leidub (Charette ja Gray, 2000). *E. coli*-s näidati, et täielikult modifitseerimata fenüülalaniini tRNA kasutamisel translatsioonil suurenes vigade arv 8,6 korda. Pseudouridiinid esinevad antikoodonlingus küllaltki sageli, mistõttu arvatakse, et lingustruktuuri stabiliseerides aitavad need tRNA-de ja ribosoomivahelisi interaktsioone peenhäälestada ja mõjutada seeläbi nii dekodeerimistäpsust kui ka lugemisraami hoidmist (Harrington jt., 1993).

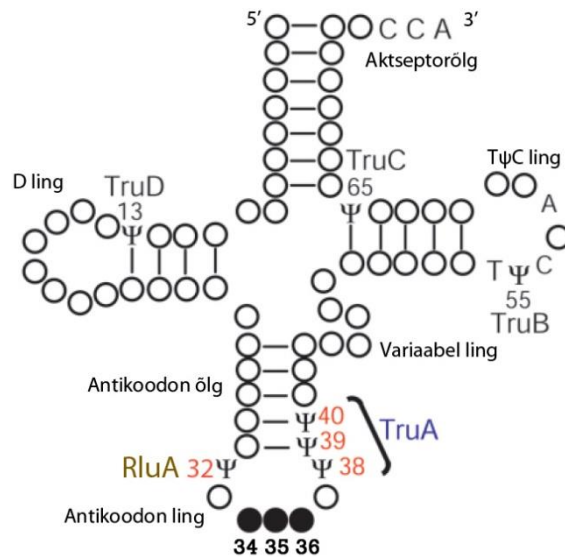
Ribosoomis leidub Ψ nii väikeses kui ka suures subühikus. *E. coli* ribosoomi suures subühikus on näidatud Ψ -de klasterdumist funktsionaalselt olulistes domeenides. Kuigi üksteisest kaugel primaar- ja sekundaarstruktuuris, koonduvad Ψ klastrid ribosoomi suure subühiku tertsiaarstruktuuris PTC ümber, mis viitab seosele translatsiooniga (Brimacombe jt., 1993). Katalüütiliselt olulist rolli Ψ siiski ilmselt ei mängi, sest *Thermus aquaticus*-es on näidatud, et modifitseerimata rRNA-ga ribosoomis küll väheneb kuid siiski säilib peptidüültransferaase aktiivsus (Khaitovich jt., 1999). *E. coli* väikeses subühikus paiknev $\Psi 516$ asub järjestuses, mis arvatakse mängivat rolli koodon-antikoodon paardumise täpsel kontrollil (Bakin jt., 1994).

RNA-sse tekitatakse pseudouridiine posttranskriptsiooniliste modifikatsioonidena. Pseudouridiini süntaasid on ensüümid, mis katalüüsivad uridiinjääkide isomerisatsiooni pseudouridiiniks. Neile ensüümidele on iseloomulikuks suur substraadi spetsiifilisus: isomeriseeritav uridiin tuntakse RNA kontekstis ära tänu struktuursetele või järjestuslikele

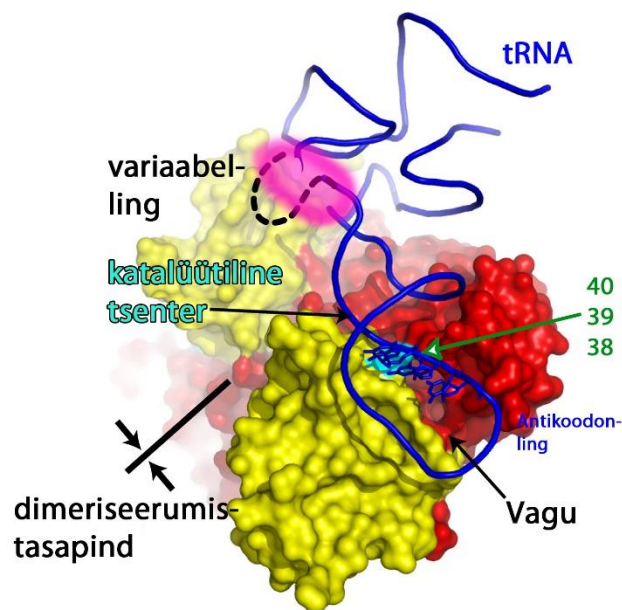
elementidele (Hamma ja Ferré-D'Amaré, 2006). Osad süntaasid katalüüsivad reaktsiooni vaid ühes positsioonis, näiteks ensüüm RsuA, mis *E. coli*-s isomeriseerib 16s rRNA 516. positsiooni uridiini (Wrzesinski jt., 1995). TruB samas isomeriseerib kõikide tRNA-de T-lingus paiknevat U55 (Nurse jt., 1995). RluA sihtmärgiks olevaid järjestus- ning struktuurimotiive leidub nii tRNA-s kui ka rRNA-s, seega modifitseerib RluA kahte erinevat tüüpi RNA-d (Hoang jt., 2006). Vaba uridiini pseudouridiini süntaasid ei isomeriseeri, mistõttu ei saa Ψ sattuda RNA-ahelasse transkriptsiooni käigus. Kofaktoreid või lisaenergiat need ensüümid samuti ei vaja. Lisaks on näidatud, et kõigi Ψ -süntaaside katalüütilises tsentris on konserveerunud asparagiinhape, mis viitab, et need ensüümid kasutavad uridiini isomeriseerimisel ühesugust katalüütilist mehhanismi (Hamma ja Ferré-D'Amaré, 2006).

1.3.2 Pseudouridiini süntaas TruA

TruA on esimesena kirjeldatud ning isoleeritud Ψ -süntaas *E. coli*-s, samuti määrati Ψ -süntaasidest esimesena TruA kristallstruktuur (Kammen jt., 1988, Foster jt., 2000). TruA homolooge on kirjeldatud nii pärmis (Pus3p) kui ka inimeses (hPus1) (Lecointe jt., 1998, Czudnochowski jt., 2013). TruA erineb teistest Ψ -süntaasidest mitmeti. TruA esineb rakkudes homodimeerina, ülejäänud Ψ -süntaasid monomeeridena (Hamma ja Ferré-D'Amaré, 2006). Dimeerne TruA on 66 kDa molekulmassiga valk. Kummagi subühiku N- ja C-terminaalsed domeenid moodustavad kõrvuti paiknedes vao, kus paikneb katalüütiline tsester. Nii TruB, mis isomeriseerib tRNA-d positsioonis U55, kui ka TruA, mis modifitseerib uridiine tRNA positsioonides 38-40 (joonis 5), kasutavad substraatidena mitut erinevat tRNA-d (Hur ja Stroud, 2007). TruB seondub universaalselt konserveerunud järjestusele oma sihtmärgi ümber (Gu jt., 1998). TruA sihtmärkpositsioone ümbritsevad erinevates tRNA-des erinev nukleotiidne järjestus. Seega puudub TruA-l kindel äratundmisjärjestus sihtmärgi ümber. On näidatud, et üks dimeerse TruA subühikutest interakteerub konserveerunud järjestusega väljaspool sihtmärkpositsioone, täpsemalt T- ja D-lingust moodustunud konserveerunud struktuuriga (joonis 6). Sellise seondumise tagajärjel paigutub antikoodonling TruA teise subühiku katalüütilisse tsentrisse. Antikoodonlingul on teatud määral võimalik painduda ning see võimaldab TruA-l ühe katalüütilise tsentriga modifitseerida kolmes erinevas positsioonis paiknevaid nukleotide. Kokku modifitseerib TruA *E. coli*-s 17 erinevat tRNA-d (Hur ja Stroud, 2007).



Joonis 5. Pseudouridiinide positsioonid bakteriaalses tRNA-s koos neid tekitava süntaasiga. Punasega on märgitud TruA ja RluA modifitseeritavad positsioonid ning mustad ringid on antikoodoni positsioonid (tRNA 34. positsioon vastab mRNA koodoni 3. positsioonile, 35. positsioon vastab koodoni 2. positsioonile ning 36. positsioon koodoni 1. positsioonile) (Muudetud Dong jt. 2006).



Joonis 6. TruA dimeeri ja tRNA vaheline seondumine. Kollaselt on värvitud TruA N-terminaalsed domeenid, punaselt C-terminaalsed domeenid. Helesinine tähistab katalüütilise aminohappe (asparagiinhape) asukohta, tumesinine on tRNA. Rohelise noolega on näidatud TruA modifitseeritavad positsioonid. Roosaga on märgitud ligikaudne piirkond, kus TruA interakteerub tRNA T- ja D-linguga. (Muudetud Hur ja Stroud, 2007).

Salmonella typhimurium-is on näidatud, et TruA puudumisel väheneb valgusünteesi kiirus 20-25%. Lisaks tõuseb TruA mutantidel tundlikkus translatsiooni elongatsiooni mõjutavate antibiootikumide suhtes nagu tetratsükliin, klooramfenikool ning puromütsiin, kuid tundlikkus ei muutunud translatsiooni initsiatsiooni (streptolüdigiin) ning transkriptsiooni

(kasugamütsiin) mõjutavate antibiootikumide suhtes (Palmer jt., 1983). *E. coli*-s ning *S. typhimurium*-is on näidatud, et TruA puudumisel on häiritud korrektse lugemisraami hoidmine ning soodustatud raaminihke toimumine. Raaminihke toimumist mõõdeti erinevatel leutsiini koodonitel ning selgus, et pseudouridiinide puudumisel vastavate leutsiini tRNA-de positsioonides 38-40 sagenes raaminihe 1,5 – 3 korda. Efekt erines koodonite lõikes, mis viitab, et pseudouridiinide olulisus sõltub koodonkontekstist (Li jt., 1997, Urbonavičius jt., 2001). Vastupidiselt prokariöodis näidatud tulemustele, muutub pagaripärmis *Saccharomyces cerevisiae* translatsioon TruA homoloogi Pus3p puudumisel täpsemaks. Pus3p-defektsetes rakkudes, kus puuduvad pseudouridiinid tRNA positsioonides 38 ja 39 (Pus3p ei isomeriseeri pärmis positsiooni 40) tehtud uuringud näitasid, et nii raaminihke kui ka stoppkoodoni ülelugemise sagedus langes. Samuti väheneb Pus3p-defektsete rakkude kasvukiirus, eelkõige optimaalsest erineval temperatuuril (Lecointe jt., 2002). Meie laboris identifitseeriti bakteri *Pseudomonas putida* mutatsioonisagedust mõjutavate geenide seas ka *truA* ning leiti, et *truA* puudumisel tõuseb spontaansete mutantide tekkesagedus umbes 5 korda *P. putida* eksponentsiaalselt kasvavates rakkudes (Tagel jt., 2016). Varasemalt pole bakterites kirjeldatud TruA seost mutatsiooniliste protsessidega.

1.3.3 Pseudouridiini süntaas RluA

RluA on pseudouridiinisüntaas, mis isomeriseerib uridiini tRNA positsioonis 32 ning 23S rRNA positsioonis 746 (Wrzesinski jt., 1995). Sellist võimet modifitseerida kahte erinevat tüüpi RNA-d ehk topeltspetsiifilisust on bakteris leiduvatel Ψ-süntaasidel kirjeldatud veel vaid *E. coli* RluF-il, mille sihtmärgid asuvad 23S rRNA-s (positsioon 2604) ja türosiini-tRNA-s (positsioon 35) (Addepalli ja Limbach, 2016). Pagaripärmis on kirjeldatud topeltspetsiifilist Ψ-süntaasi Pus1p, mis modifitseerib uridiini nii tRNA-s kui ka snoRNA-s (väike tuumakese RNA) (Massenet jt., 1999).

E. coli RluA substraatidel on konserveerunud nukleotiidne järjestus 5'-ΨUXXAAA-3', kus Ψ tähistab RluA isomeriseeritavat positsiooni ning X ükskõik millist nukleotiidi. RluA sihtmärkjärjestus paikneb nii rRNA-s kui ka tRNA-s lingus, ning ensüüm-RNA kompleks on mõlemal juhul väga sarnane. *E. coli*-s on 4 tRNA-d, mis sisaldavad RluA äratundmisjärjestust. Ei ole teada, kas funktsionaalselt on raku jaoks olulised nii rRNA kui ka tRNA modifikatsioonid või on kummagi RNA puhul tegemist lihtsalt juhuslikult sama sihtmärkjärjestuse esinemisega (Hoang jt., 2006).

RluA puudumisel on fenotüübile väike mõju. *E. coli*-s on näidatud, et RluA-defektse tüve kasvukiirus ei erine metsiktüüpi tüvest, kuid kui kasvati $\Delta rluA$ mutanti ning metsiktüve koos, siis konkureeris metsiktüvi $\Delta rluA$ tüve välja (Raychaudhuri jt., 1999). Kuna meie laboris

on eelnevalt näidatud, et TruA puudumine suurendab mutatsioonisagedust *P. putida*-s, siis uuriti, kas TruA-ga sarnaselt antikoodonlingu modifitseeriva pseudouridiini süntaasi RluA puudumine mõjutab mutatsioonide teket. Selgus, et RluA puudumisel on *P. putida* eksponentsiaalselt kasvavates rakkudes samuti mutantide tekkesagedus suurenenud ligi 3 – 6 korda (Lvovs, 2017; Tagel, avaldamata andmed).

2. Eksperimentaalne osa

2.1 Töö eesmärgid

Pseudouridiinid on kõige laiemalt levinud RNA posttranskriptsioonilised modifikatsioonid. Tänu vabale N1-H-le võib pseudouridiin moodusta lisavesiniksideme, mis aitab stabiliseerida RNA struktuuri. Osaliselt konserveerunud paiknemine rRNA ja tRNA valgusünteesiks olulistest piirkondades viitab nende seosele translatsiooniga ent siiski ei ole teada, mis on Ψ täpne funktsioon RNA-s (Charette ja Gray, 2000). Seega puudub ka hea seletus Ψ laiale levikule ning konserveerumisele.

Meie laboris on näidatud, et pseudouridiini süntaaside – TruA ja RluA – puudumisel tõuseb mutatsioonisageduse bakterites *Pseudomonas putida* ning *Pseudomonas aeruginosa* (Tagel jt., 2016, Tagel, avaldamata). Mõlemad nimetatud Ψ -süntaasidest tekitavad pseudouridiine tRNA antikoodonlingus. Kuna varasemalt on näidatud, et modifikatsioonid tRNA antikoodonlingus mõjutavad valgusünteesi täpsust, tekkis hüpotees, et nähtud efekt mutatsioonisagedusele võib olla tingitud sagenenud vigadest valgusünteesil. Translatsioonivigade tagajärjel võivad juhuslikult tekkinud vead proteoomis mõjutada ka DNA-d.

Kuna nähtud efekt mutatsioonisagedusele tuli välja erinevates bakteriliikides, võib eeldada, et seos mutatsioonisageduse ning translatsiooni täpsuse vahel ei ole vaid liigispetsiifiline nähtus. Võib ka eeldada, et tegemist on mõne universaalsema mehhanismiga, mida pole varem kirjeldatud. Samuti ei ole teadaolevalt varem püütud võrrelda translatsioonivigade sagedust erinevates liikides. Sellest lähtuvalt said minu töö eesmärkideks seatud:

1. leida testsüsteem, mis võimaldab sarnastes tingimustes mõõta translatsiooni täpsust erinevates bakteriliikides;
2. võrrelda translatsioonivigade tekkimise sagedust bakteriliikides *P. putida* PaW85, *P.aeruginosa* PAO1 ja *E. coli* MG1655;
3. selgitada välja, kas tRNA antikoodonlingu pseudouridiinid positsioonides 32 ja 38-40 mõjutavad translatsiooni täpsust;
4. analüüsida, kas tRNA antikoodonlingu pseudouridiinide tähtsus võib muutuda aminoglükosiidide stressi korral

2.2 Materjal ja metoodika

2.2.1 Kasutatud söötmed, bakteritüved ja plasmiidid

Baktereid kasvatati LB (ingl k – *lysogeny broth*) täissöötmes (1% trüptoon, 0,5% pärmiekstrakt, 0,5% NaCl) või M9 glükoos CAA söötmes (edaspidi glcCAA), mille valmistamiseks lisati M9 puhvrissi (42 mM KH_2PO_4 , 24 mM Na_2HPO_4 , 19 mM NH_4Cl , 9 mM NaCl) mikroelementide lahust (lõppkontsentratsioonidega 666 μM MgO, 50 μM CaCO_3 , 40 μM FeSO_4 , 12,5 μM ZnSO_4 , 12,5 μM MnSO_4 , 2,5 μM CuSO_4 , 2,5 μM , CoSO_4 , 1,9 μM H_3BO_4), glükoosi (lõppkontsentratsiooniga 0,2%) ning kaseiini hüdrolysaati (CAA; ingl k *casamino acids*; lõppkontsentratsiooniga 0,2%). Tardsöötme saamiseks lisati söötmesse agarit 1,5 g/l. *P. putida* rakke kasvatati temperatuuril 30°C, *E. coli* ja *P. aeruginosa* rakke temperatuuril 37°C, kui ei ole välja toodud teisiti. Vedelsöötmes kasvatamisel aereeriti kultuure loksutil. Töös kasutatud bakteritüved on toodud välja lisas 1.

Selekteerimisel kasutati järgmisi antibiootikume: ampitsilliini (Amp, 100 $\mu\text{g/ml}$), kanamütsiini (Km, 50 $\mu\text{g/ml}$), gentamütsiini (Gm, 10 $\mu\text{g/ml}$), karbenitsilliini (Cb, 100 $\mu\text{g/ml}$), bensüülpenitsilliini (Bp 1,5 $\mu\text{g/ml}$).

2.2.2 Kompetentsete rakkude valmistamine ja DNA viimine rakkudesse

P. putida ja *P. aeruginosa* kompetentsete rakkude valmistamiseks kasvatati rakke üleöö 5 ml-s LB vedelsöötmes. 250 μl üleöökultuuri tsentrifuugiti kokku (1 min 12 000 x g) ning pesti 3 korda 600-800 μl 300 mM sahharoosi lahusega. Rakud suspendeeriti 50-100 μl 300 mM sahharoosi lahuses.

Plasmiidse DNA viimiseks kompetentsetesse *P. putida* ja *P. aeruginosa* rakkudesse kasutati elektroporatsiooni. Kompetentsetele rakkudele lisati ~100 ng vees lahustatud plasmiidset DNA-d ning segu viidi elektroporatsiooniküveti. Elektroporatsioon teostati firma *BioRad* elektroporaatoriga „*E. coli* pulser“ pingel 2,5 kV. Elektroporatsiooni järgselt pesti rakud küvetist ~1 ml LB söötmega välja ning kasvatati 45-60 minutit temperatuuril 30°C (*P. putida*) või 37°C (*P. aeruginosa*) ning plaaditi seejärel selektiivsöötmele.

E. coli kompetentsete rakkude valmistamiseks kasvatati rakke üleöö 5 ml-s LB vedelsöötmes. 50 μl üleöökultuuriga inokuleeriti värske 2 ml LB vedelsöötme, kuhu oli lisatud MgCl_2 (lõppkontsentratsiooniga 20 mM) ning rakke kasvatati ~3 tundi. Seejärel hoiti rakke 15 minutit jääl ning tsentrifuugiti kokku (3 min 12 000 x g). Rakud suspendeeriti 1,5 ml külmas RF1 lahuses (1,2 RbCl , 0,99% $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0,15% $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 30 mM KAc (pH 7,5), 10,5% glütserool) ning hoiti 30 min jääl. Rakud tsentrifuugiti kokku (4 min 3000 x g) ning

suspendeeriti 200 µl külmas RF2 lahuses (10 mM MOPS, 0,12% RbCl, 1,1% CaCl₂*2H₂O, 15% glütserool) ja hoiti 10 min jääl.

Plasmiidne DNA viidi kompetentsetesse *E. coli* rakkudesse keemilise transformatsiooni teel. Selle jaoks lisati 50-100 µl kompetentsetele rakkudele ~100 ng vees lahustatud plasmiidset DNA-d ning segu hoiti 30 min jääl. Seejärel tehti rakkudele kuumašokk (1 min 42°C) ning hoiti seejärel 3 min jääl. Järgnevalt inkubeeriti rakke 1 h 1 ml-s LB vedelsöötmes temperatuuril 37°C ning plaaditi seejärel selektiivsöötmele.

2.2.3 Polümeraasi ahelreaktsioon (PCR)

PCR-i kasutati plasmidi kontrolliks ning Gm^r (gentamütsiini resistentsusgeeni) ülesamplitseerimiseks. PCR segu lõppmahuks oli 20 µl ning sisaldas: 1x PCR-puhver (75 mM Tris-Hcl pH 8,8; 20 mM (NH₄)₂SO₄; 0,01% Tween 20); 2,5 mM MgCl₂; 0,2 mM dNTP; 10 pmol kumbagi praimerit; 0,5 U Taq DNA polümeraasi. Matriitsina kasutati bakterirakkudest pärit DNA-d. Töös kasutatud praimerid on toodud tabelis 1.

Reaktsioon koosnes 25 tsüklist, mille osad olid: 1) DNA denaturatsioon (45 sekundit 96°C); 2) praimer seondumine matriitsile (45 sekundit 55-58°C); 3) DNA süntees (72°C). DNA sünteesiaeg sõltus amplifitseeritava fragmendi pikkusest arvestusega, et Taq polümeriseerib 1000 aluspaari 1 minutis. Esimesele tsüklile eelnes 3 minutiline eelkuumutus (96°C). Viimasele tsüklile järgnes 5 minutiline järelsüntees (72°C), mille jooksul sünteesiti lõpuni kõik pooleli olevad fragmendid.

Tabel 1. Töös kasutatud praimerid

Praimer	Nukleotiidne järjestus (restriktaasi lõikesait allajoonitud)	Kasutamine
LacZ- <u>Cla</u> -uus	5'-CCACGCTC <u>ATCGATA</u> ATTTTCAC-3'	<i>lacZ</i> testsüsteemi kontrollimine koloonia PCR-il
Prtac	5'-AATTAATCATCGGCTCGTATAA-3'	Komplementaarne <i>tac</i> -promootoriga, suunaga <i>tac</i> -promootori kontrolli all oleval geenile
FlucDIR1	5'AGCTTCTGCCAACCGAACGGAC-3'	Topeltlutsiferaas testsüsteemi

		kontrollimine koloonia PCR-il
Gm-Fw- <u>SpeI</u>	5'- TAACTAGTTGACATAAGCCTGTTCGG-3'	Gm ^r geeni ülesamplitseerimiseks pBBR1 MCS5-lt
Gentr-Rev- <u>SpeI</u>	5'- TTAACTAGTTAGGTGGCGGTACTTGGGT -3'	

2.2.4 Kloonimine

Kloonimisel kasutati DNA restriksiooniks, ligeerimiseks ja vektori aluselise fosfataasiga töötamiseks firma *Thermo Scientific* ensüüme ning reaktsioonipuhvreid, järgides tootja etteantud tingimusi. Nii restriksioonisegude, PCR-i produktide kui ka ligaasisegude sadestamiseks lisati 2,5x mahus 96% etanooli ning 0,1x mahus 5M NaCl lahust. Sadenemine toimus temperatuuril -20°C 15 minuti jooksul, mille järel sadet tsentrifuugiti temperatuuril 4°C (12 minutit 12 000 g) ning pesti kaks korda 80% etanooliga. DNA sade kuivatati temperatuuril 37°C ning suspendeeriti 10 µl milliQ vees.

Rakkudest plasmiidse DNA eraldamiseks kasutati firma *Favorgen* plasmiidieraldus komplekti *FavorPrep Plasmid Extraction Mini Kit*, järgides tootja protokollit.

Käesolevas töös klooniti vektorisse pSEVA 417 Gm^r geeni. Selle jaoks amplifitseeriti plasmiidilt pBBR1 MCS5 (lisa 1) üles Gm^r geen, kasutades selleks primereid Gm-Fw-SpeI ning Gentr-Rev-SpeI (tabel 1). PCR produkt sadestati ning lõigati restriктаasiga *SpeI*. *SpeI*-ga avati ka pSEVA 417 vektorit, mida töödeldi aluselise fosfataasiga. Gm^r geeni klooniti vektorisse pSEVA 417 kasutades T4 DNA ligaasi järgides tootja protokollit. Ligaasisegu sadestati ning elektroporeeriti *P. putida* rakkudesse ning plaaditi Gm selektiivsöötmele. Gm^r geeni kloonimise edukust kontrolliti nii PCR-ga, kasutades primereid Gm-Fw-SpeI ning Gentr-Rev-SpeI (tabel 1), kui DNA restriksioonanalüüsiga.

2.2.5 Geelelektroforees

PCR-i produkte ja restriктаasidega lõigatud DNA-d analüüsiti geelelektroforeesil. Analüüsitavale proovile lisati 6 µl foreesivärvi (0,04 % broomfenoolsinine 50% glütseroolis) ning kanti 1% agarooosgeelile 1xTAE puhvril (50 mM Tris-atsetaat, 1 mM EDTA pH 8,2), mis sisaldas etiidiumbromiidi lõppkontsentratsiooniga 0,33 µg/ml. DNA fragmentide suuruse hindamiseks kasutati firma *Thermo Scientific* DNA markerit. Elektroforees teostati pingel 130V. Tulemused visualiseeriti UV valguses.

2.2.6 *lacZ* testsüsteemiga translatsiooni täpsuse mõõtmine

Translatsiooni täpsuse mõõtmiseks viidi uuritud bakteriliikide metsiktüvedesse järgmised plasmiidid: pKT25, pKT163, pKT3/4, pKT +1FS, pKT -1FS. Need plasmiidid on meie laboris konstrueeritud varasemalt kirjanduses avaldatud kitsa peremeesringiga pSG plasmiididest (O'Connor jt., 1992, O'Connor ja Dahlberg, 1993) *lacZ* testsüsteemi sisaldavate DNA regioonide ümbertõstmisel laia peremeesringiga pKT2440 plasmidi.

Plasmiidiga rakud inokuleeriti (2 ml) glcCAA söötmes ning inkubeeriti loksutis üleöö temperatuuril 30°C selektiivse β -laktaamse antibiootikumi juuresolekul (*P. putida* – Bp, *P. aeruginosa* – Cb, *E. coli* – Amp). Rakukultuur lahjendati värskesse glcCAA söötmesse, mis sisaldas IPTG-d (lõppkontsentratsioon 0,5 mM) kuni OD₅₈₀~0,1 (optiline tihedus lainepikkusel 580 nm). Rakke kasvatati kuni OD₅₈₀~0,5 (~2 h) ning tõsteti seejärel jääle. Mõõdeti OD₅₈₀.

β -galaktosidaasi eriaktiivsuse määramiseks kasutati Milleri meetodit, millele vastavalt valmistati reaktsioonisegu: 1600 μ l Z-puhvrit (60 mM Na₂HPO₄, 40 mM NaH₂PO₄, 10 mM KCl, 1 mM MgSO₄, 50 mM β -merkaptotetanool, 0,0005% SDS; pH 7), 200 μ l ONPG-d (orto-nitrofenüül- β -D-galaktopüranosiid, 4 mg/ml) ja 100 μ l kloroformi (Miller, 1972). Reaktsioon käivitati 50 μ l bakterikultuuri lisamisega, algusaeg fikseeriti. Reaktsioonisegus kollase värvuse ilmnemisel peatati reaktsioon 1000 μ l 1M Na₂CO₃-ga, fikseeriti reaktsiooni toimumise aeg. Reaktsioonisegu optilised tihedused mõõdeti lainepikkustel 420 ja 550 nm. β -galaktosidaasi eriaktiivsus (E) arvutati välja Milleri ühikutes, kasutades valemit:

$$E = \frac{1000 \cdot (OD_{420} - 1,75 \cdot OD_{550})}{t \cdot V \cdot OD_{580}},$$

kus t on reaktsiooniaeg minutites, V reaktsioonis kasutatud bakterikultuuri maht milliliitrites, OD₄₂₀ on reaktsioonisegus mõõdetud orto-nitrofenooli neeldumine, OD₅₅₀ on reaktsioonisegus lüüsunud rakkude tihedus ning OD₅₈₀ on rakukultuuri tihedus.

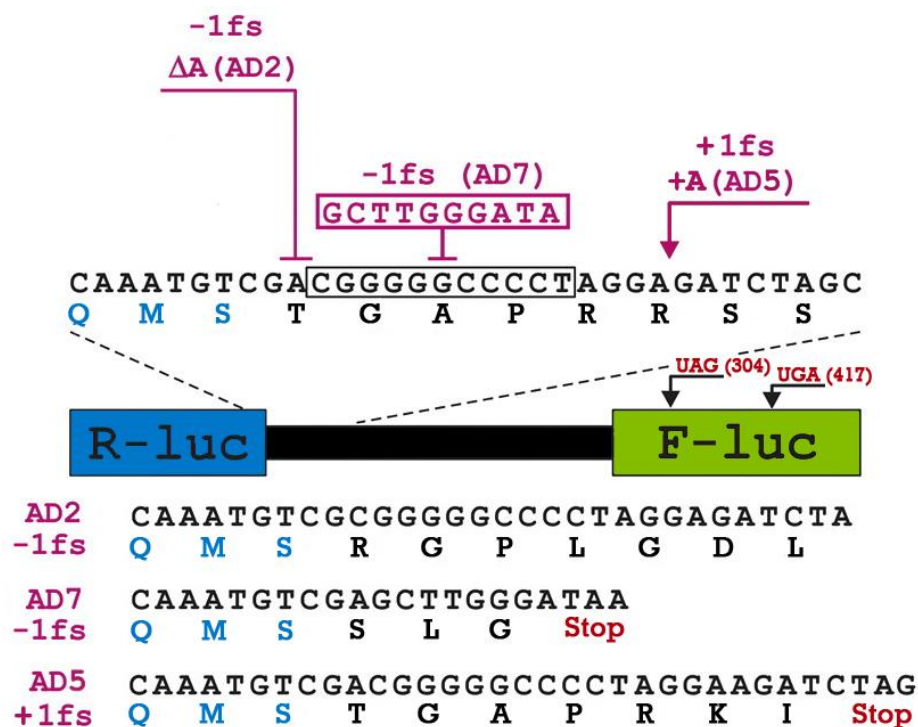
2.2.7 Plasmidi stabiilsuse kontroll

Plasmidi pKT2440 stabiilsuse jälgimiseks kasvatati plasmiidiga rakke üleöö LB söötmes ilma antibiootikumita. Seejärel tehti lahjenduste rida M9 puhvrissi. Lahjendustest tilgutati 5 μ l LB tardsöötmele, mis sisaldas X-Gal (100 μ g/ml), IPTG-d (0,5 mM) ning selektiivset antibiootikumi.

2.2.8 Topeltlutsiferaasi testsüsteemiga translatsiooni täpsuse mõõtmine

Translatsiooni täpsuse mõõtmiseks topeltlutsiferaasi testsüsteemiga viidi kõikidesse uuritud tüvedesse erinevad pSEVA plasmiidid: pSEVA AD2, pSEVA AD5, pSEVA AD7,

pSEVA 304, pSEVA 417 (joonis 7). Need põhinevad varasemalt avaldatud pEK4 baasil plasmiididel (Devaraj jt., 2009). Kuna *P. aeruginosa* on Km suhtes tundetum võrreldes teiste uuritud bakteritega, ei olnud võimalik kasutada Km, et selekteerida *P. aeruginosa* vektoriga rakke. *P. aeruginosa*-s translatsiooni täpsuse mõõtmiseks konstrueeriti nimetatud plasmiidide derivaadid, kuhu oli lisatud Gm^r geen.



Joonis 7. Skemaatiline esitus topeltlutsiferaasi testsüsteemist. Näidatud on testsüsteemilt kodeeritud liitvalg, kus fluoresteeruvad valgud Rluc ja Fluc on märgitud vastavalt siniselt ja roheliselt ning nendevaheline *linker*-regioon mustalt. Joonise üleval on toodud *linker*-regiooni natiivne nukleotiidne ning aminohappeline järjestus. Lillaga on näidatud vastavates vektorites olevad mutatsioonid. Testsüsteemi all on toodud välja nukleotiidne ning aminohappeline järjestus (aminohape märgitud vastava koodoni esimese nukleotiidi alla) iga vektori korral. Stoppkoodonid on näidatud punaselt (Muudetud, Lilleorg jt., 2017).

Plasmiidiga rakud inokuleeriti 1,5 ml glcCAA söötmes kuhu oli lisatud antibiootikumi (Km 50 µg/ml *P. putida* ning *E. coli* korral ning Gm 10 µg/ml *P. aeruginosa*) ning kasvatati 16 h. Rakukultuur lahjendati kuni OD₅₈₀=0,1 värskesse glcCAA söötmesse, kuhu oli lisatud IPTG (lõppkontsentratsioon 0,5 mM). Rakke kasvatati mahus 2 ml (vektorid AD2, AD5 ja AD7) või 4 ml (vektorid 304 ja 417) 3 h loksutil (OD₅₈₀~0,4-0,7). Rakukultuuridest, mis sisaldasid vektoreid AD2, AD5 ja AD7 tsentrifuugiti analüüsimiseks kokku 1 ml ning vektoreid 304 ja 417 sisaldavaid rakukultuure 1,5 ml (2,5 min 21 000 x g). Supernatant eemaldati ning rakusade külmutati vedelas lämmastikus. Seejärel suspendeeriti rakud 400 µl-s firma *Promega* 1x lüüsipuhvris *Passive lysis buffer* ning asetati 10 minutiks jääle. Kõiki rakukultuure kasvatati antud katses temperatuuril 30°C.

Mõõtmine teostati *TECAN infinite M200 Pro* mikrotiiterpladilugejaga. Mikrotiiterpladile kanti 50 µl rakulüsaati ning lisati 50 µl firma *Promega* topeltlutsiferaasi testsüsteemi Fluc-i substraati LAR II (LAR – *luciferase assay reagent*) ning lahused segati suspenderides. LAR II lisamisel käivitati kell. Pladilugejaga mõõdeti valguse eraldumist 10 sekundi jooksul 2 minutit pärast LAR II lisamist. Seejärel mikrotiiterpladil olev reaktsioonisegu lahjendati 50x 1x *Passive lysis buffer* lüüsipuhvriga ning 100 µl-le lahjendatud reaktsioonisegule lisati 50 µl Rluc-i substraati *Stop&Glo*, mis peatab esimese reaktsiooni ning on substraadiks teisele reaktsioonile. *Stop&Glo* lisati reaktsioonisegule, kui esmasest LAR II lisamisest oli möödunud 4 minutit ning pladilugejaga mõõdeti valguse eraldumist 10 sekundi jooksul kui LAR II lisamisest oli möödunud 6 minutit. Reaktsioonide väärtused arvutati lahjenduste põhjal sama rakulüsaadi tiheduse kohta.

2.2.9 Minimaalse inhibeeriva kontsentratsiooni (MIC) määramine

Uuritud *P. putida* tüvedel määrati streptomütsiini (Sm) minimaalne inhibeeriv kontsentratsioon (MIC; ingl k – *minimal inhibitory concentration*) ehk vähim antibiootikumi kontsentratsioon, mille korral ei ole rakud enam suutelised kasvama. Selle jaoks kasvatati bakterikultuure glcCAA söötmes üleöö 30°C juures. Mikrotiiterpladil tehti glcCAA söötmesse Sm 2x lahjenduste rida alates maksimaalsest kontsentratsioonist 160 µg/ml. Seejärel lisati mikrotiiterpladile üleöö kultuuri 100-kordset lahjendust ning plaati inkubeeriti üleöö temperatuuril 30°C. Spektrofotomeetri *TECAN Sunrise* abil mõõdeti bakterikultuuride OD₅₈₀.

2.2.10 *P. putida* tüvede kasvukõverate mõõtmine

Kasvukõvera koostamiseks kasvatati vektoriga rakke üleöö glcCAA söötmes koos antibiootikumi selektsiooniga. Üleöö kultuuriga inokuleeriti värsket glcCAA nii, et arvutuslikult oleks vedelkultuuri OD₅₈₀~0,05. Rakukultuur jagati mikrotiiterpladile 100 µl kaupa laiali ning plaati inkubeeriti temperatuuril 30°C *POLARstar Omega* spektrofotomeetris, mis mõõtis kultuuride optilist tihedust iga 7 minuti tagant 21 tunni jooksul.

2.2.11 Statistiline analüüs

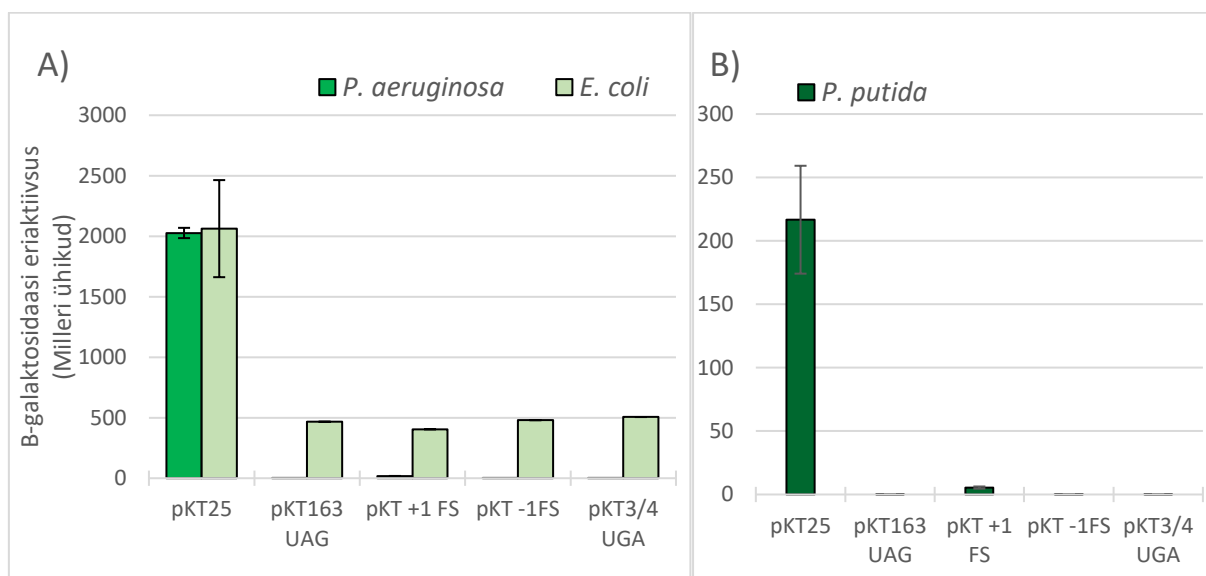
Statistiliseks analüüsiks kasutati programmi Statistica64. Andmete normaaljaotuse olemasolu kontrollimiseks kasutati Shapiro-Wilki testi. Käesoleva töö tulemustes normaaljaotus puudus, mistõttu kasutati statistilise erinevuse määramiseks Kruskal-Wallise mitteparameetrilist testi, mis ei tee eeldusi andmete jaotumise kohta.

2.3 Tulemused

2.3.1 Translatsiooni täpsuse mõõtmine *lacZ* reportergeenil põhineva testsüsteemiga bakterites *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas aeruginosa* ja *Escherichia coli*

Selleks, et mõõta translatsioonitäpsust erinevates bakteriliikides kasutasime varasemalt kirjeldatud *lacZ* testsüsteemi (O'Connor jt., 1992, O'Connor ja Dahlberg, 1993). See testsüsteem paikneb enterobakterispetsiifilises plasmiidis pSG ning erinevaid translatsioonivigade signaale sisaldavad pSG vektorid saadi lahke kingina Jaanus Remme grupilt. Meie laboris kloonis Heili Ilves testsüsteemid pSG vektoritest laia peremeesringiga vektorisse pKT2440, et võimaldada nende kasutamist ka pseudomonaadides. Testsüsteem põhineb mutatsiooni kandva reportergeeni *lacZ* aktiivsuse mõõtmisel, kus positiivne signaal saadakse juhul, kui translatsiooni ebatäpsuse tõttu mutatsiooni efekt kaob ning tekib funktsionaalne valk. Käesolevas töös olid kasutusel nii nukleotiidi insertiooni või deletsiooniga testsüsteemid, mis nõuavad vastavalt -1 või +1 raaminihet funktsionaalsuse taastamiseks, või enneaegseid stoppkoodoneid sisaldava *lacZ*-iga testsüsteem, kus aktiivsus säilib, kui ribosoom stoppkoodonit ära ei tunne (lisa 1).

lacZ testsüsteemiga translatsiooni täpsuse mõõtmise tulemused on esitatud joonisel 8.



Joonis 8. β -galaktosidaasi eriaktiivsus *lacZ* testsüsteemiga *E. coli* ja *P. aeruginosa* rakkudes (A) ning *P. putida* (B) rakkudes. X teljel on mõõtmisel kasutatud vektorid (pKT25 – mutatsioonideta *lacZ*). Bakteriliigid on tähistatud erinevate värvidega. Esitatud on kolme sõltumatu bakterikoloonia tulemuste keskväärtus koos standardhälbe.

Juba esialgsetest tulemustest selgus, et β -galaktosidaasi eriaktiivsus *P. putida*-s ning *P. aeruginosa*-s jäi kõigi mutatsioonidega vektorite korral allapoole detekteerimispiiri, v.a +1 raaminihke vektor, mille väärtus oli napilt mõõdetav. Suure erinevuse tõttu mõõdetud

eriaktiivsuses on *P. aeruginosa* ning *E. coli* tulemused esitatud erineval skaalal *P. putida* tulemustest.

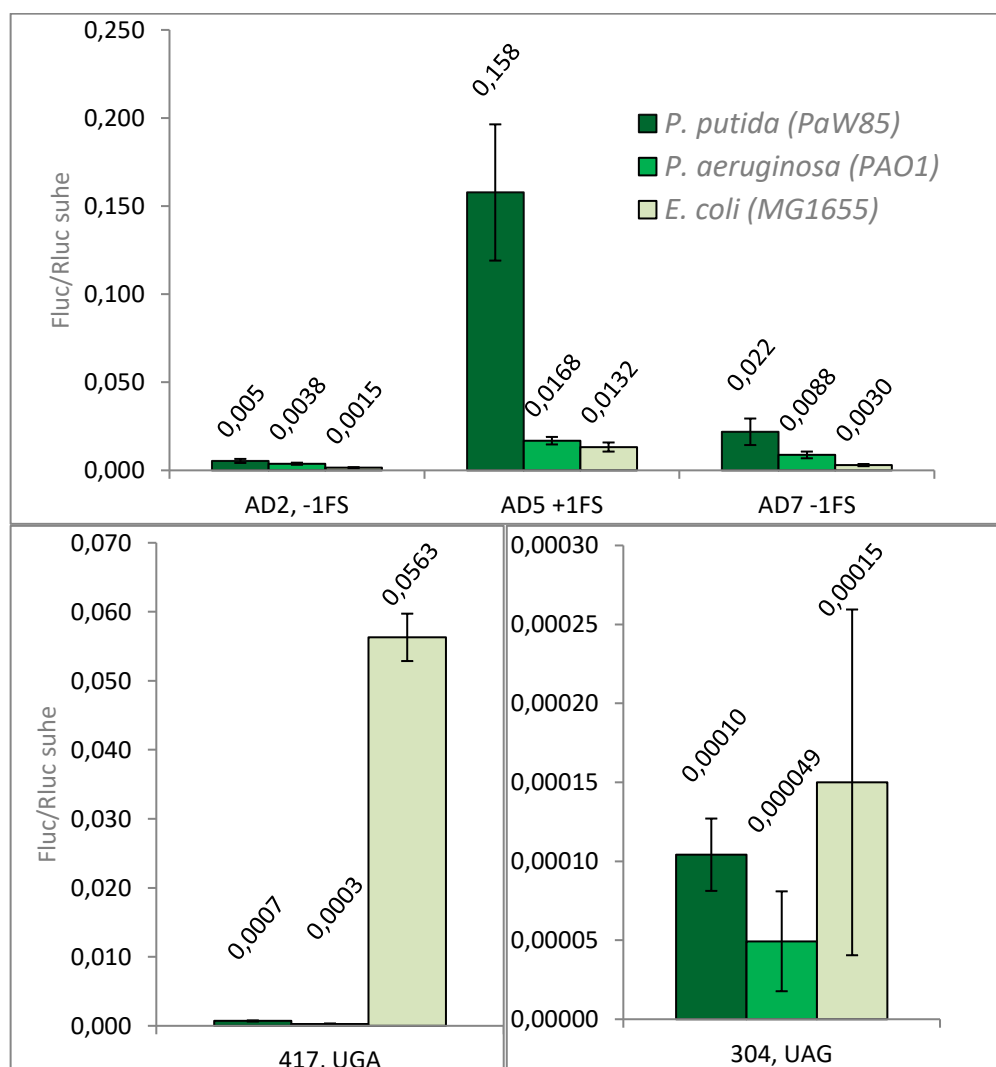
E. coli-s olid kõik mutatsioonidega vektorid mõõdetavad ning aktiivsusest omavahel võrreldavas vahemikus. Kõigi uuritud vektorite eriaktiivsuste suhe mutatsioonideta *lacZ* vektori väärtusesse jäi vahemikku 20-25%, mis viitab üllatavalt ebatäpsele translatsioonile. Järgnevalt analüüsisin *lacZ* reporteril põhineva testsüsteemi stabiilsust. Selgus, et mutatsioonideta vektori korral (pKT25) testsüsteemi IPTG-ga indutseerides tekib *E. coli* populatsioonis kiiresti heterogeensus, kus osad rakud olid testsüsteemi sisaldava vektoriga ning osad olid vektori kaotanud (Lisa 2). *P. putida*-s ning *P. aeruginosa*-s sellist heterogeensust ei täheldatud. Kuna indutseerimise ajal puudub selektiivse antibiootikumi surve, jäävad sellised vektorita bakterid ellu ning optilise tiheduse mõõtmisel ei ole enam võimalik eristada vektorit sisaldavaid ning vektori kaotanud baktereid. Rakukultuuri optilise tiheduse põhjal arvutan β -galaktosidaasi eriaktiivsust, kuid heterogeense rakukultuuri korral on mõõdetud aktiivsus „pärit“ vaid mingist osast rakukultuuris olevatest bakteritest. Seega võib eeldada, et tegelik mutatsioonideta vektori eriaktiivsus on kõrgem. Mutatsioonidega vektorite puhul, mille korral β -galaktosidaasi tekib vähem, ma sellist heterogeensust ei täheldanud, mistõttu võib eeldada, et liiga suur hulk β -galaktosidaasi on *E. coli*-le toksiline. Seega ei ole ka usaldusväärne arvatud suhteline translatsioonitäpsus, kui võrrelda mutatsioonidega vektori eriaktiivsust mutatsioonideta vektoriga.

Kuna tulemused *E. coli*-s olid ebausaldusväärsed ning pseudomonaadides translatsiooni täpsuse mõõtmist pKT plasmiidis asuv *lacZ* testsüsteem ei võimaldanud, siis ei sobinud see testsüsteem antud töös püsitatud eesmärkide täitmiseks.

2.3.2 Translatsiooni täpsuse mõõtmine topeltlutsiferaasi testsüsteemiga bakterites *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas aeruginosa* ja *Escherichia coli*

Topeltlutsiferaasi testsüsteemis on kaks lutsiferaasi (Rluc ja Fluc) ühendatud liitvalgus, kuid kummagi ensüümi aktiivsust on võimalik eraldi mõõta. Mutatsioonideta testsüsteemi korral on nende lutsiferaaside aktiivsuste suhe 1:1 (tulemusi pole näidatud). Testsüsteemi korral, kus nende geenide vahelisse *linker*-regiooni on nukleotiide lisatud või eemaldatud nii, et muutub lugemisraam, või on operonis tagapool paiknevas *fluc* geenis enneagne stoppkoodon, toodetakse funktsionaalset Fluc lutsiferaasi vaid juhul, kui translatsioonivea tõttu mutatsiooni kahjulik efekt nullitakse. Rluc aktiivsus on indikaatoriks operoni translatsiooni taseme kohta ning Fluc ja Rluc suhe võimaldab sellisel juhul määrata uuritava translatsioonivea suhtelise sageduse.

Käesolevas töös uurisin nii raaminihete toimumist (-1 ja +1 raaminihe) kui ka stoppkoodonite ülelugemist. -1 raaminihet jälgisin kahes erinevas koodonkontekstis (joonis 7). Algselt enterobakterispetsiifilises plasmiidis pBAD-RFluc asunud testsüsteem on meie laboris kloonitud laia peremeesringiga vektorisse pSEVA-lacI-tac, mis võimaldab samu vektoreid kasutades mõõta translatsiooni täpsust erinevates bakteriliikides. Kuna *P. aeruginosa* rakud on oluliselt tundetumad Km-le, ei sobinud algsed pSEVA vektorid *P. aeruginosa*-s kasutamiseks, sest puudus võimalus selekteerida vektoriga rakke. Selle jaoks kasutati *P. aeruginosa*-s nimetatud vektorite derivaate, kuhu oli lisatud Gm^r geen. Selline vektor ei mõjutanud testsüsteemiga saadud tulemusi *P. putida*-s võrreldes ainult Km^r pSEVA vektoriga (andmeid pole esitatud). Joonisel 9 on esitatud topeltlutsiferaasi testsüsteemiga mõõdetud translatsioonivigade suhteline sagedus bakterites *P. putida*, *P. aeruginosa* ja *E. coli*.



Joonis 9. Translatsioonivigade suhteline sagedus uuritud bakteri liikides. X-teljel on näidatud kasutatud vektori nimi ning translatsiooniviga, mille toimumist jälgiti (FS – raaminihe, UGA/UAG – vastava stoppkoodoni ülelugemine). Y-teljel on arvatud Fluc/Rluc väärtuste suhe. Joonisel on toodud vähemalt 3 sõltumatu katse tulemuste keskvärtused koos 95% usalduspiiridega (igas katses 4 bioloogilist replikaati). Kõikides katsetes on baktereid kasvatatud glcCAA söötmes temperatuuril 30°C.

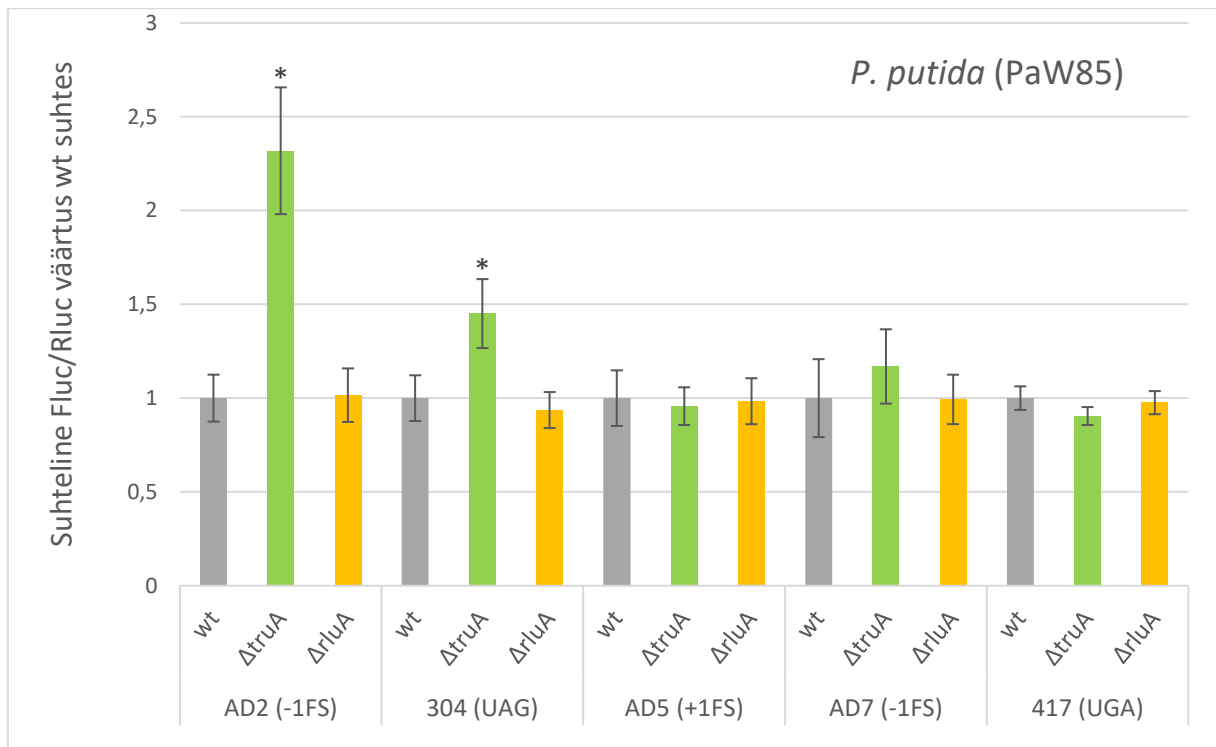
Tulemustest on näha, et translatsioonivigade sagedus sõltub oluliselt nii bakteri liigist, translatsioonivea tüübist kui ka koodonkontekstist. *P. putida* ning *P. aeruginosa* bakterites on kõik jälgitud raaminihke sündmused sagedasemad kui stoppkoodonite ülelugemine. *E. coli*-s on UGA stoppkoodoni ülelugemine töös mõõdetud sündmustest kõige sagedasem, kuid UAG stoppkoodoni ülelugemine sarnaselt *P. putida* ning *P. aeruginosa* rakkudele kõige haruldasem.

Jälgitud raaminihke sündmused on esinemissageduse järgi järjestades kõigis liikides samas järjekorras. Kõige sagedasemalt toimub +1 raaminihe (AD5 vektori kontekstis), -1 raaminihe toimub sagedasemalt AD7 vektori kui AD2 vektori kontekstis. Samuti on kõigi vektorite korral näha, et enim raaminihke vigu tehakse käesolevas töös jälgitud koodonkontekstides *P. putida* bakterites, kõige vähem *E. coli*-s.

Raaminihke sündmuste toimumissagedus jäi üldiselt kõigis liikides vahemikku 0,1-2%, kuid +1 raaminihe toimus *P. putida*-s sagedusega 15,8%, mis on üllatavalt kõrge. Stoppkoodoni UAG ülelugemine oli mõõdetud sündmustest kõige haruldasem, toimudes vaid ligikaudu 0,01% juhtudest. Kuigi väärtused olid käesoleva testsüsteemi alumise detekteerimispiiri ligidal, näitab nende mõõdetavus, et topeltlutsiferaasi testsüsteem on väga tundlik ning sobib hästi translatsioonivigade sageduse mõõtmiseks.

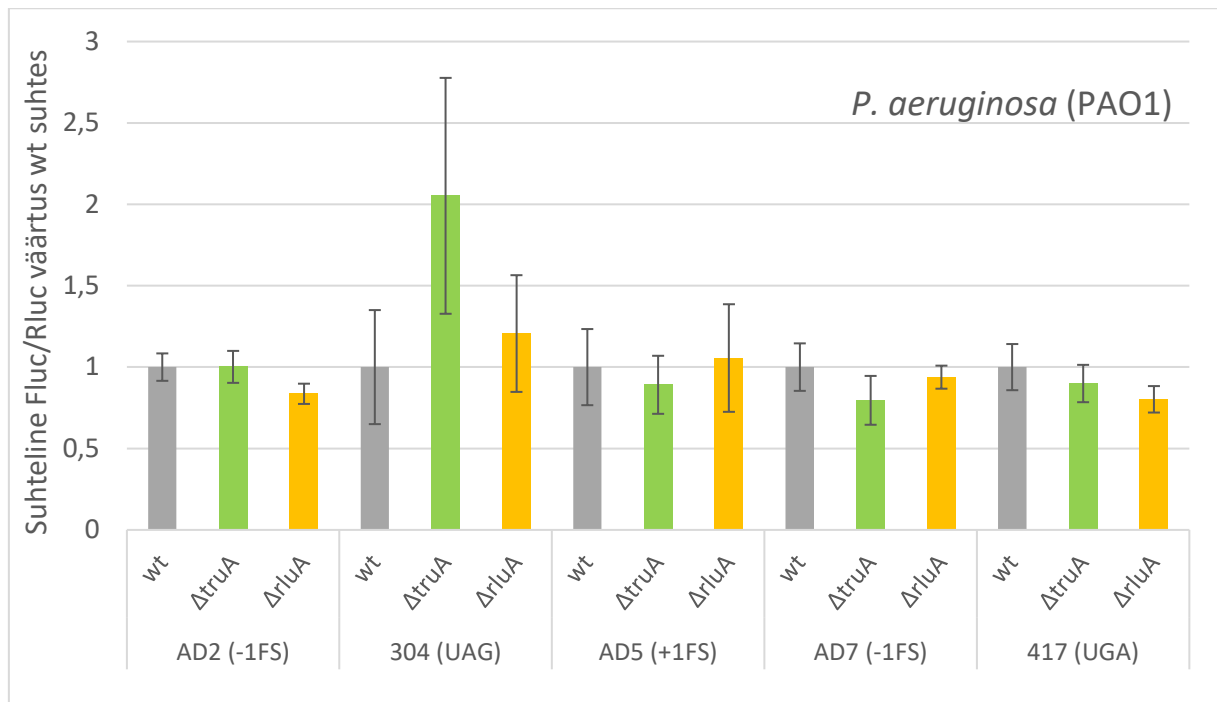
2.3.3 Ψ 32 ning Ψ 38-40 mõju translatsiooni täpsusele

Pseudomonas putida, *Pseudomonas aeruginosa* ja *Escherichia coli* varasemalt konstrueeritud Δ *truA* (pseudouridiini süntaas TruA isomeriseerib U-d tRNA positsioonides 38-40) ja Δ *rluA* (RluA isomeriseerib U-d tRNA positsioonis 32) tüvedesse viisin sisse topeltlutsiferaasi testsüsteemi kandvad vektorid ning mõõtsin translatsioonivigade suhtelist sagedust. Tulemused bakteris *P. putida* on näidatud joonisel 10, *P. aeruginosa* tulemused joonisel 11 ja *E. coli* tulemused joonisel 12. Iga vektori puhul on Δ *truA* ja Δ *rluA* translatsioonivigade suhtelist sagedust võrreldud metsiktüübi (*wt*) translatsioonivigade suhtelise sagedusega.



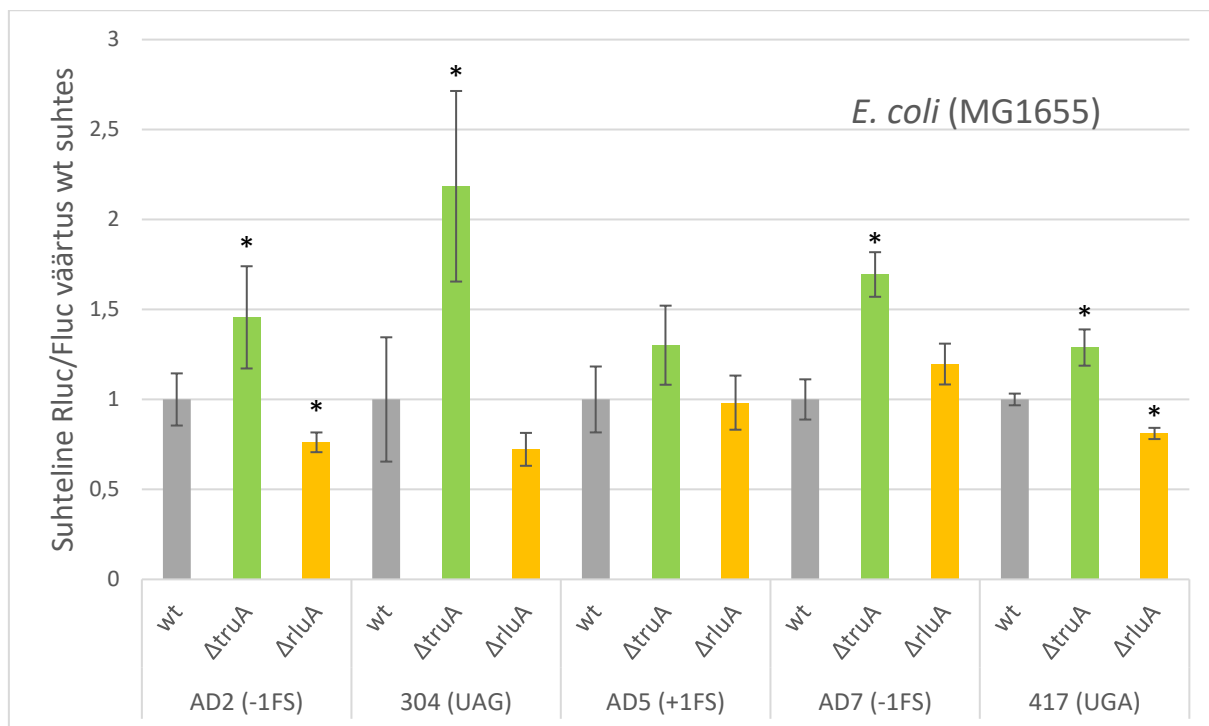
Joonis 10. Normaliseeritud translatsioonivigade suhteline sagedus *P. putida* $\Delta truA$ ja $\Delta rluA$ tüvedes. Graafikul esitatud väärtused on saadud võrreldes sama vektori piires deletsioonitüvede Fluc/Rluc väärtust *wt*-väärtusega. Iga vektoriga on kõigis tüvedes tehtud vähemalt 3 sõltumatut katset (igas katses 4 bioloogilist replikaati) ning tulemused on esitatud koos 95% usalduspiiridega. Rakke kasvatati glcCAA söötmes temperatuuril 30°C. Deletsioonitüvede Fluc/Rluc suhet on võrreldud sama vektoriga mõõdetud metsiktüve Fluc/Rluc suhtega kasutades Kruskal-Wallise testi. * tähistab p-väärtust <0,05.

Joonisel 10 esitatud *P. putida* tulemustest selgub, et TruA puudumisel suureneb -1 raaminihke sagedus (AD2) ~2,2 korda ning UAG stoppkoodoni ülelugemine ~1,4 korda võrreldes metsiktüübiga ning nähtud efektid on statistiliselt olulised. RluA puudumine translatsiooni täpsust uuritud kontekstides ei mõjutanud.



Joonis 11. Normaliseeritud translatsioonivigade suhteline sagedus *P. aeruginosa* $\Delta truA$ ja $\Delta rluA$ tüvedes. Graafikul esitatud väärtused on saadud võrreldes sama vektori piires deletsioonitüvede Fluc/Rluc väärtust *wt*-väärtusega. Iga vektoriga on kõigis tüvedes tehtud vähemalt 3 sõltumatut katset (igas katses 4 bioloogilist replikaati) ning tulemused on esitatud koos 95% usalduspiiridega. Rakke kasvatati glcCAA söötmes temperatuuril 30°C.

Erinevalt *P. putida*-st ei mõjuta TruA puudumine -1 raaminihke (AD2) toimumise sagedust *P. aeruginosa*-s (joonis 11). Sarnaselt *P. putida*-le on näha stoppkoodoni UAG ülelugemise sagenemist TruA-defektses tüves (~2 korda), kuigi erinevus metsiktüübist ei ole statistiliselt oluline ning mõõdetud väärtuste seas oli suur variatsioon. Ülejäänud vektorite (AD5, AD7 ja 417) korral ei muutu translatsioonivigade sagedus uuritud deletsioontüvedes. Samuti on tulemustest näha, et ka *P. aeruginosa*-s RluA puudumine translatsiooni täpsust ei mõjuta.



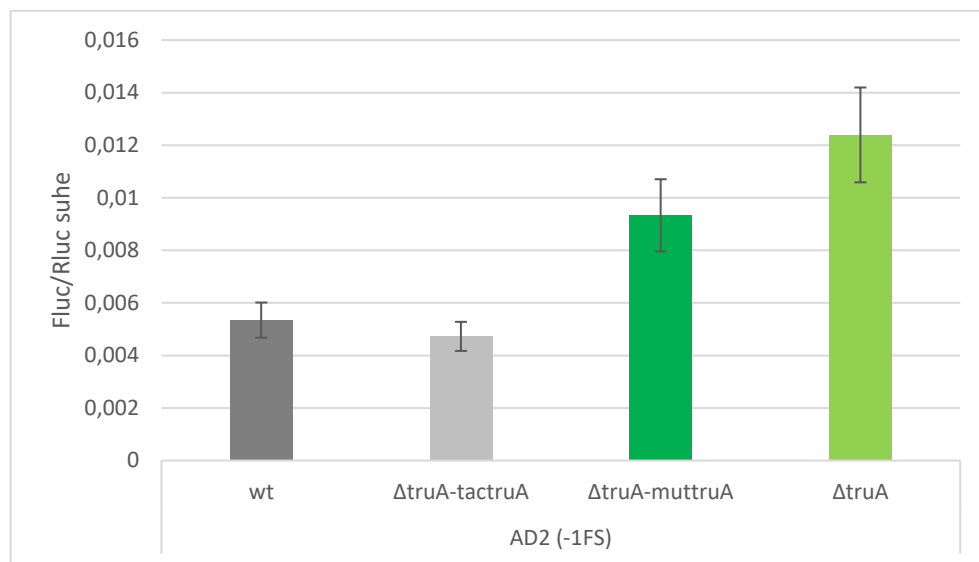
Joonis 12. Normaliseeritud translatsioonivigade suhteline sagedus *E. coli* $\Delta truA$ ja $\Delta rluA$ tüvedes. Graafikul esitatud väärtused on saadud võrreldes sama vektori piires deletsioonitüvede Fluc/Rluc väärtust *wt*-väärtusega. Iga vektoriga on kõigis tüvedes tehtud vähemalt 3 sõltumatut katset (igas katses 4 bioloogilist replikaati) ning tulemused on esitatud koos 95% usalduspiiridega. Rakke kasvatati glcCAA söötmes temperatuuril 30°C. Deletsioonitüvede Fluc/Rluc suhet on võrreldud sama vektoriga mõõdetud metsiktüve Fluc/Rluc suhtega kasutades Kruskal-Wallise testi. * tähistab p -väärtust $<0,05$.

E. coli tulemustest joonisel 12 on näha, et erinevalt *P. putida* ja *P. aeruginosa* rakkudest, suurendab TruA puudumine translatsioonivigade sagedust kõikide jälgitud sündmuste puhul ning erinevus on statistiliselt oluline kõigil, v.a +1 raaminihke (AD5) korral. TruA puudumise efekt on suurim UAG stoppkoodoni ülelugemisel (~2,2 korda). *E. coli*-s väheneb RluA puudumisel -1 raaminihke toimumine (AD2) ning stoppkoodonite ülelugemine võrreldes metsiktüübiga. Kuigi efekt on väike (vigade sagedus RluA-defektses tüves on mainitud juhtudel ~0,7 *wt*-väärtusest), on raaminihke ning UAG stoppkoodoni ülelugemisel mõõdetud erinevus statistiliselt oluline.

2.3.4 Pseudouridiini süntaasi TruA efekt tuleneb katalüütilisest aktiivsusest

Järgnevalt soovisin kontrollida, kas *P. putida*-s nähtud $\Delta truA$ efekt translatsiooni täpsusele on tingitud just nimelt TruA kui valgu puudumisest ja tegemist ei ole polaarse efektiga ehk *truA* geeni deleteerimise tulemusena toimunud genoomi ümberkorraldusel on kuidagi mõjutatud muude geenide ekspressioon. Selle jaoks kasutasime *P. putida* TruA komplementatsioonitüve $\Delta truA$ -*tactruA*, kus $\Delta truA$ tüve kromosoomi on viidud

minitransposoon Tn7 koosseisus *tac* promootori kontrolli all funktsionaalne *truA* geen. Kontrollimaks, kas efekt tuleneb just nimelt TruA katalüütilisest aktiivsusest, kasutasin tüve $\Delta truA$ -muttruA, kus Tn7 abil on $\Delta truA$ tüve kromosoomi viidud katalüütiliselt inaktiivne TruA, mis on samuti *tac* promootori all (lisa 1). Katalüütiliselt inaktiivse TruA geenis on 70. koodonpositsioonis asparagiinhappe koodon vahetatudalaniini koodoni vastu. Kuna suurim efekt TruA puudumisel oli *P. putida*-s -1 raaminihkele (AD2), siis teostati mõõtmised selle vektoriga. Tulemused on näidatud joonisel 13.



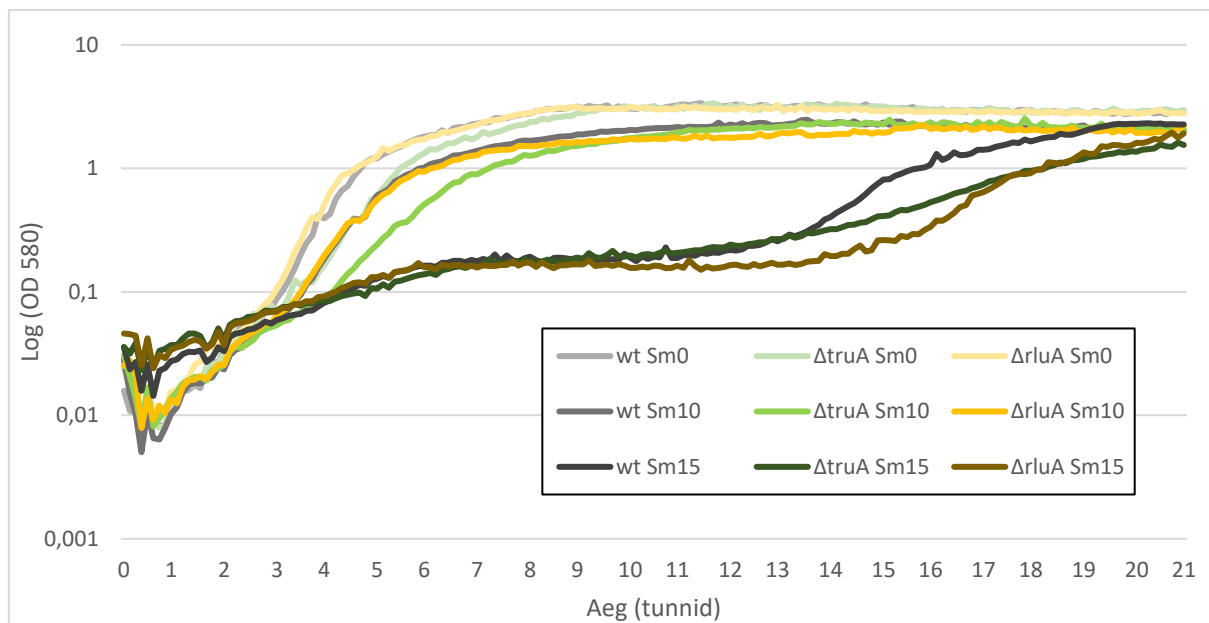
Joonis 13. Translatsioonivigade suhteline sagedus *P. putida* $\Delta truA$ -tactruA ja $\Delta truA$ -muttruA rakkudes AD2 vektoriga (-1 FS). Graafikul on näidatud vastavas tüves saadud Fluc väärtuse suhe Rluc väärtusesse. Näidatud on 3 sõltumatu katse tulemuste keskvväärtused koos 95% usalduspiiridega (igas katses 4 bioloogilist replikaati).

Kuna tulemustest on näha, et komplementeerides $\Delta truA$ tüve funktsionaalse *truA* geeniga, taastub *wt* tase, siis võib järeldada, et *P. putida*-s nähtud translatsioonivigade sagenemine AD2 vektori korral (joonis 10) on tõesti põhjustatud pseudouridiini süntaasi TruA puudumisest. Komplementeerides $\Delta truA$ tüve katalüütiliselt inaktiivset TruA-d kodeerivad geeniga, jäi translatsioonivigade sagedus $\Delta truA$ tüvega võrreldavasse vahemikku, mis näitab, et nähtud efekt on tingitud just nimelt TruA katalüütilisest aktiivsusest ehk võimest uridiine tRNA-s isomeriseerida. Statistiline analüüs Kruskal-Wallise testiga kinnitas statistilist olulisust (p-väärtus <0,01) $\Delta truA$ -muttruA ja metsiktüve Fluc/Rluc väärtuste vahel. Erinevused $\Delta truA$ -muttruA ja $\Delta truA$ vahel ning $\Delta truA$ -tactruA ja metsiktüve vahel ei ole statistiliselt olulised.

2.3.5 Streptomütsiini mõju translatsiooni täpsusele *P. putida*-s

Kirjanduses on varasemalt näidatud, et subletaalsed aminoglükosiidsete antibiootikumide kontsentratsioonid suurendavad translatsioonivigade hulka (Kramer ja

Farabaugh, 2007). Seetõttu püstitus hüpotees, et võib olla on pseudouridiinide olulisus selgemini nähtav translatsiooni mõjutavate antibiootikumide juuresolekul. Translatsiooni täpsuse mõõtmiseks subletaalsel antibiootikumi kontsentratsioonil, pidin esmalt tegema kindlaks sobiva streptomütsiini (Sm) kontsentratsiooni. Kõigepealt määrasin uuritavate *P. putida* tüvede Sm MIC väärtuse, milleks oli 40 µg/ml. Järgnevalt mõõtsin *P. putida* tüvede (wt, $\Delta truA$, $\Delta rluA$) kasvukiirust vedelkultuuris erinevate MIC-st madalamate Sm kontsentratsioonide juuresolekul (0; 10; 15; 20 µg/ml). Koostatud kasvukõverad on toodud joonisel 14.

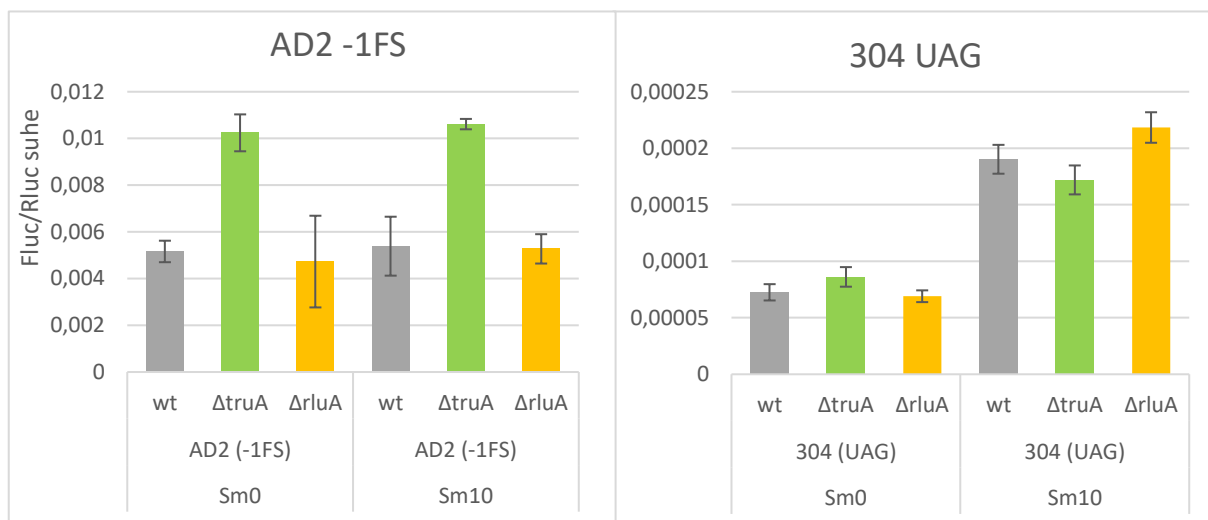


Joonis 14. *P. putida* PaW85 tüvede (wt, $\Delta truA$, $\Delta rluA$) rakukultuuride optiliste tiheduste keskvaartused erinevate streptomütsiini kontsentratsioonide juuresolekul 21 tunni vältel. Rakke kasvatati glcCAA söötmes temperatuuril 30°C. Sm0 – ilma Sm vedelkultuur; Sm10 – Sm konts. 10 µg/ml; Sm15 – Sm konts. 15 µg/ml. Näidatud on ühe katse tulemuse keskmine (katses 8 tehnilist replikaati), mistõttu ei ole veapiire joonisele kantud.

Soovisin leida antibiootikumi kontsentratsiooni, mis oluliselt ei pärssiks rakkude kasvukiirust, kuna vastasel juhul võivad translatsiooni täpsuse mõõtmisel (kus rakke kasvatatakse 3h) olla antibiootikumi juuresolekul kasvanud rakud teises kasvufaasis võrreldes antibiootikumita kasvanud rakkudega. Jooniselt 14 on näha, et juba 15 µg/ml Sm kontsentratsioon pärssib oluliselt rakkude kasvu ning pikendab *lag*-faasi. Sm kontsentratsioonil 20 µg/ml oli kasvukiirusele veel pärssivam efekt, mistõttu ei ole neid tulemusi joonisele kantud. Kuigi vähesel määral mõjutab kasvukiirust ka 10 µg/ml kontsentratsioon, siis otsustasin valida edasiseks katseks selle kontsentratsiooni.

Järgnevalt kasutasin määratud subletaalset Sm kontsentratsiooni (10 µg/ml), mille juuresolekul mõõtsin translatsiooni täpsust *P. putida* tüvedes (wt, $\Delta truA$, $\Delta rluA$). Katsesse

kaasasin need vektorid, millel olin varasemates katsetes täheldanud TruA puudumisel efekti translatsiooni täpsusele (AD2 ja 304). Tulemused on toodud joonisel 15.



Joonis 15. Translatsioonivigade suhteline sagedus *P. putida* tüvedes (wt, $\Delta truA$, $\Delta rluA$) nii streptomütsiinita kui subletaalse streptomütsiini kontsentratsioonil (Sm – 10 $\mu\text{g/ml}$).

Joonisel 15 esitatud tulemustest selgub, et subletaalsel kontsentratsioonil streptomütsiini juuresolek ei mõjuta -1 raaminihke toimumise sagedust ei *P. putida* metsiktüvel ega ka $\Delta truA$ ja $\Delta rluA$ tüvedel. Samas säilis TruA puudumise efekt translatsiooni täpsusele. Stoppkoodoni UAG ülelugemine sagenes kõigis uuritud *P. putida* tüvedes umbes 2-2,5 korda, kuid mõnevõrra üllatuslikult kadus Sm juuresolekul TruA efekt.

3. Arutelu

Varasemalt on kirjanduses kirjeldatud erinevaid testsüsteeme, mille abil on võimalik translatsiooni täpsust hinnata. Valdavalt on prokariootides translatsiooni täpsust hinnatud *E. coli*-s, seega on ka välja töötatud süsteemid mõeldud just *E. coli*-ga töötamiseks. Kuna käesoleva töö eesmärgiks oli võrrelda mitut erinevat bakteriliiki, tuli leida testsüsteem, mis töötaks lisaks *E. coli*-le ka *P. putida* ja *P. aeruginosa* rakkudes. Esmalt katsetasin β -galaktosidaasi aktiivsusel põhinevat testsüsteemi, mis on meie laboris varasemalt algsest enterobakteri-spetsiifilisest pSG vektorist (O'Connor jt., 1992, O'Connor ja Dahlberg, 1993) kloonitud laia peremeesringiga vektorisse pKT2440. Nimetatud testsüsteem ei osutunud siiski rakendatavaks *Pseudomonas*-e perekonna bakterites, kuna pole piisavalt tundlik (joonis 8). Järgnevalt katsetatud topeltlutsiferaas testsüsteem Rluc-Fluc, mis on samuti meie laboris kloonitud laia peremeesringiga vektorisse, võimaldas samades tingimustes mõõta valgusünteesi täpsust kõigis uuritud bakterites (joonis 9). Tänu sisemisele kontrollile ning tundlikkusele, sobib see süsteem hästi antud töös kasutamiseks. Kuna varasemalt on samade reporteritega süsteeme kasutatud erinevate bioloogiliste protsesside uurimiseks väga erinevates organismides (nii pro- kui ka eukariootides) (Harger ja Dinman, 2003, Kramer ja Farabaugh, 2007, Alcaraz-Pérez jt., 2008), siis võib eeldada, et ka eri bakteriliikides saadud tulemused on usaldusväärsed ning neid saab omavahel võrrelda.

3.1 Valgusünteesi täpsus erinevates bakteriliikides

Kuigi üldine valgusünteesi printsiip on erinevates bakteriliikides sama, siis translatsioonil osalevates molekulides ning mehhanismides esineb väikesi erisusi, mille tõttu on vähesel määral erinev ka iga liigi translatsioon. Näiteks, olemasolevate tRNA geenide arv, isoaktseptoorsete tRNA-de jaotumise suhe, tRNA ja rRNA primaarjärjestus ja modifikatsioonide muster ning koodonkasutus võivad kõik mingil määral eri liikides erineda ning seeläbi ka mõjutada ka valgusünteesi.

Kasutades Rluc-Fluc topeltlutsiferaasi testsüsteemi, mõõtsin ning võrdlesin translatsiooni täpsust *P. putida* PaW85, *P. aeruginosa* PAO1 ning *E. coli* MG1655 rakkudes (joonis 9). Tulemustest selgus, et translatsioonivigade profiil on uuritud rakkudes ning jälgitud koodonkontekstis küllaltki erinev. Sama nukleotiidne järjestus AD5 vektori kontekstis soosib +1 raaminihet *P. putida*-s ~10x sagedasemalt kui teistes uuritud bakterites, sagedusega ~16%. Varasemalt hästi uuritud raaminihke signaalidest on näidatud, et retroviiruste *gag-pol* raaminihke sagedus on 5%, kuid *E. coli dnaX* geenil toimuva raaminihke sagedus on 50% (Larsen jt., 1997, Shehu-Xhilaga jt., 2001). Seega on tegemist väga tugeva raaminihke

signaaliga just nimelt *P. putida*-s, kuid puudub hea seletus, miks see nii on. *lacZ* testsüsteemis (teistsuguses koodonkontekstis) olid +1 raaminihked ainukesed mõõdetavad translatsioonivead *Pseudomonas*-e perekonna bakterites, mis viitab, et +1 raaminihe võib olla sagedasem kui –1 raaminihe (joonis 8).

E. coli-s on kirjeldatud UGA stoppkoodonil translatsiooni termineerumise asemel toimuv rekodeerimine, mille käigus UGA koodonil lisatakse polüpeptiidi kõige sagemini trüptofaan või selenotsüsteiin (Engelberg-Kulka, 1981, Vacher jt., 1984, Berry ja Larsen, 1993). Valke, mis vajavad oma natiivses struktuuris mingis positsioonis selenotsüsteiini, nimetatakse selenovalkudeks. Nende valkude mRNA-s on UGA koodoni järel spetsiifiline sekundaarstruktuur, mis võimaldab madala sagedusega UGA koodonil polüpeptiidi lülitada selenotsüsteiini ning translatsioonil jätkuda. Kuna topeltlutsiferaasi testsüsteemis on enneaegne UGA koodon tekitatud punktmutatsioonina natiivsesse *fluc*-i geeni, võib eeldada, et sellele ei järgne ka nimetatud spetsiifiline sekundaarstruktuur. Seega võib eeldada, et valdavalt loeb UGA koodonit üle trüptofaani tRNA. *E. coli*-s on näidatud, et see tRNA on hüpermodifitseeritud 37. positsioonis (kohe antikoodoni kõrval, joonis 5) ning see modifikatsioon võimaldabki trüptofaani tRNA antikoodonil (UGG) paarduda UGA koodoniga (Vacher jt., 1984). MiaA on modifikatsiooni ensüüm, mille substraadiks on U-ga algavaid koodoneid lugivate tRNA-de 37. positsiooni A nukleotiid, mille MiaA modifitseerib i⁶A-ks (N6-isopentenüüladenosiiniks). Sama nukleotiidi modifitseerib *E. coli*-s ka MiaB, mille tulemusena on selliste tRNA-de 37. positsioonis ms²i⁶A (2-metüültio-N6-pentenüüladenosiin) ning MiaB puudumisel on näidatud UGA koodoni ülelugemise vähenemist (Petrullo jt., 1983, Vacher jt., 1984, Zhao jt., 2001). Teadaolevalt puudub MiaB homoloog *Pseudomonas*-e perekonnas, seega võib nimetatud modifikatsiooni puudumine olla põhjuseks, miks oli minu katsetes *Pseudomonas*-e perekonna bakteritel UGA ülelugemise tase madalam. UAG stoppkoodoni ülelugemine ei ole uuritud liikides väga erinev ning ka kirjanduses on näidatud, et vähemalt *E. coli*-s toimub see madalama sagedusega kui UGA ülelugemine (Petrullo jt., 1983), mis klapib minu saadud tulemustega, kus nägin, et UAG stoppkoodonit loetakse minu uuritud kontekstis ~350 korda madalama sagedusega üle kui UGA stoppkoodonit (joonis 9).

Translatsiooni täpsuse mõõtmine on alati väga kontekstispetsiifiline. Ei ole võimalik teha liialt üldistavaid järeldusi translatsiooni kohta, kui jälgida translatsiooni täpsust kindlates koodonkontekstides. Siiski on käesoleva töö tulemustes näha vähemalt tendentsi, et *P. putida*-s indutseerivad raaminihke signaalid raaminihke toimumist tugevamalt kui teistes uuritud bakterites.

3.2 Ψ32, Ψ38-40 mõju valgusünteesi täpsusele

Pseudouridiinid (Ψ) on RNA-s kõige sagedasemalt esinev posttranskriptsiooniline modifikatsioon. rRNA-s paiknevad Ψ-d konserveerunult translatsioonil funktsionaalselt olulistest piirkondades, mis võib anda märku nende translatsiooni toetavast rollist translatsioonil. Siiski puudub prokarüootides hea seletus pseudouridiinide sellisele levikule ja konserveerumisele, sest näiteks *E. coli*-s on näidatud, et kõikide Ψ-de eemaldamisel rRNA-st on vaid kergelt pärssiv mõju rakkude kasvule rikkal söötmel (O'Connor jt., 2018). tRNA-s esineb Ψ veel sagedasemalt, kuid samuti puudub selge arusaam, miks see nii on. *E. coli*-s täielikult konserveerunud Ψ55 puudumisel ei ole fenotüübilist efekti (Gutgsell jt., 2000). Siiski on näidatud, et modifikatsioonid tRNA antikoodonlingus (sh pseudouridiinid) aitavad ribosoomil õiget lugemisraami säilitada (Li jt., 1997). Kuna DNA-s oleva info korrektne avaldumine valgusünteesil on bakteri kohasuse jaoks väga oluline, siis võib see osaliselt seletada Ψ-de levikut, kuigi puudub ülevaade, mil moel Ψ translatsioonil täpsust säilitab.

P. putida ja *E. coli* rakkudes oli minu tulemustes saagenud -1 raaminihe AD2 vektori kontekstis (joonised 10 ja 11). AD2 vektoril on topeltlutsiferaasi testsüsteemis deleteeritud *linker*-regiooni esimene A nukleotiid (joonis 7). Uues lugemisraamis on glütsiini tRNA-l (koodonil GGG, aminohape G) võimalik nihkuda mRNA-l 5' otsa poole (– raaminihe), mis taastaks algse lugemisraami. Lugemisraami nihkeks on vajalik translatsiooni aeglustumine. Kuna sekundaarstruktuuri esinemine mRNA 3' otsa pool on ebatõenäoline (sest sellisel juhul eksisteeriks see ka natiivses testsüsteemis ning kutsuks ka seal esile raaminihet), siis mõjutavad translatsiooni kiirust ilmselt uues lugemisraamis esinevad koodonid ning neile vastavad tRNA-d. Uues lugemisraamis on glütsiini koodoni järel proliini (P) CCC koodon, millele vastavat tRNA-d modifitseerib TruA *P. putida*-s ning *P. aeruginosa*-s, kuid mitte *E. coli*-s. Ei ole teada, miks ei muutu selles kontekstis translatsiooni täpsus *P. aeruginosa* rakkudes ning miks TruA puudumine mõjutab translatsiooni täpsust *E. coli*-s kuigi eeldatavas raaminihke kohas puuduvad koodonid, millele vastavaid tRNA-sid TruA modifitseeriks. Näiteks pärmis on näidatud, et TruA homoloogi Pus3p puudumisel translatsioonitäpsus teatud kontekstides tõuseb (Lecointe jt., 2002). On võimalik, et puuduva Ψ mõju translatsioonile ongi erinevates organismides erinev ning uuritud kontekstis aeglustab proliini tRNA, millel puudub Ψ 38. positsioonis, *P. putida*-s translatsiooni selliselt, et toimub raaminihe.

Varasemalt on kirjanduses näidatud, et Ψ-süntaasi TruB puudumisel tekib *E. coli* rakkudel rikkal söötmel kasvudefekt, mida ei põhjusta TruB isomeriseeritava Ψ puudumine, vaid mingi alternatiivne TruB funktsioon (Gutgsell jt., 2000). Oma tulemustes nägin, et *P. putida* $\Delta truA$ tüves AD2 vektori kontekstis põhjustab translatsiooni täpsuse muutumist just

nimelt Ψ puudumine ja tegemist ei ole mingi alternatiivse seni kirjeldamata TruA funktsiooniga (joonis 13). Seega võib ka eeldada, et ülejäänud nähtud efektid tulenevad TruA katalüütilisest aktiivsusest.

AD7 vektoris on kasutusel raaminihke kontekst, kus eeldatavasti toimub -1 raaminihe glütsiini GGA koodonil, kus translatsiooni aeglustab TAA (UAA mRNA-l) stoppkoodoni jõudmine A saiti (joonis 7) (Weiss jt., 1987). Kuna stoppkoodoni äratundmine toimub aeglasemalt, võib P saidis olev tRNA nihkuda. Nihkumisel taastub algne lugemisraam ning stoppkoodoni asemel satub A saiti jälle kodeeriv koodon. AD7 vektori kontekstis modifitseerib TruA nihkuvale glütsiini tRNA-le eelnevat leutsiini tRNA-d. *P. putida*-s ja *P. aeruginosa*-s ei mõjuta see translatsiooni täpsust, mistõttu võib eeldada, et E saidi tRNA Ψ 38-40 ei mõjuta raaminihet. *E. coli*-s küll translatsiooni täpsus TruA puudumisel langeb, kuid kuna seda võib täheldada kõigis uuritud kontekstides, siis võib arvata, et TruA mõjutab *E. coli*-s translatsiooni veel mingil moel lisaks tRNA-de modifitseerimisele.

Minu tulemustes on TruA puudumisel tõusnud UAG stoppkoodoni ülelugemine kõigis kolmes uuritud bakteriliigis (joonised 10-12). Varasemalt on *E. coli* rakkudes näidatud, et UAG koodonil valgusünteesi termineerumise asemel lisatakse rakkudes polüpeptiidi tavaliselt glutamiin (glutamiini koodonid on CAG ja CAA) (Nilsson ja Rydén-Aulin, 2003). Glutamiini tRNA kuulub TruA modifitseeritud tRNAde hulka kõigis minu uuritud bakterites, seega võib eeldada, et Ψ glutamiini tRNA 38. positsioonis (ainuke positsioon glutamiini tRNA-s, kus on U, mida TruA isomeriseerib) on mingil moel oluline dekodeerimisel ning selle puudumisel suureneb UAG stoppkoodoni ülelugemine ribosoomis kõigis uuritud liikides. Oluline erinevus UAG ja CAG/CAA koodonitel on koodoni esimeses positsioonis (U vs C), sest koodoni kolmandas positsioonis tekib koodon-antikoodon paardumisel Watson-Crick või *wobble* aluspaar. tRNA 38. positsioon paikneb tRNA 36. positsiooni (3. antikoodoni nukleotiid, mis paardub koodoni 1. nukleotiidiga) ligidal, seega on võimalik, et Ψ stabiliseerib antikoodoni struktuuri selliselt, et dekodeerimisel ei ole võimalik antikoodonil konformatsiooni muuta ning ribosoomil koodonit valesti lugeda. Ψ puudumisel on antikoodon vähem stabiliseeritud ning konformatsioonilise muutuse tagajärjel on suurema sagedusega võimalik, et ribosoom lubab glutamiini tRNA-l stabiilselt seonduda A saiti UAG stoppkoodoni korral ning jätkata elongatsiooni.

RluA (Ψ) puudumine ei mõjuta translatsiooni täpsust *P. putida* ja *P. aeruginosa* rakkudes. See ei ole üllatav, sest meie laboris ei ole RluA puudumisel muud fenotüübilist efekti nähtud, kui vaid mutatsioonisageduse tõusu (Tagel, avaldamata). Minu katsete tulemustest joonisel 12 võib näha, et nii stoppkoodonite ülelugemisel kui ka -1 raaminihkel (AD2) RluA

puudumine vähendab translatsioonivigu ning UGA stoppkoodoni ja raaminihke puhul on erinevus statistiliselt oluline, kuigi bioloogilise olulisuse võib kahtluse alla seada. Varasemalt kirjanduses avaldatud ning ka meie laboris tehtud katsete põhjal on *E. coli*-s RluA ainuke fenotüübiline efekt see, et metsiktüübiga segakultuuris kasvades konkureeritakse RluA-defektne tüvi välja (Raychaudhuri jt., 1999). Seega võib olla, et RluA-defektses tüves on vähesel määral translatsioon aeglustunud ning see mõjutab ka kasvudünaamikat, mis omakorda võib vähendada translatsioonivigade sagedust.

Käesolevas töös uurisin ka subletaalsel kontsentratsioonil aminoglükosiidse antibiootikumi streptomütsiini mõju translatsiooni täpsusele *P. putida*-s (joonis 15). Varasemalt on kirjanduses avaldatud, et aminoglükosiidsete antibiootikumide juuresolekul suureneb stoppkoodonite ülelugemine (Martin jt., 1989), mis kattub käesoleva töö tulemustega. Suurenenud translatsioonivigade hulk streptomütsiini juuresolekul võib varjestada TruA puudumisest tingitud efekti, mistõttu ei ole neis tingimustes TruA efekti näha. Aminoglükosiidsed antibiootikumid mõjutavad ribosoomi dekodeerimistäpsust, lubades stoppkoodonile seondunud valepaardunud tRNA korral elongatsioonil jätkuda (Ruusala ja Kurland, 1984). Aminoglükosiidsete antibiootikumide ja raaminihke vahel ei ole seost varasemalt kirjeldatud ning käesoleva töö tulemustest selgus, et vähemalt uuritud koodonkontekstides streptomütsiin raaminihke toimumise sagedust ei mõjutanud.

Varasemalt on *P. putida*-s näidatud mutatsioonisageduse tõus nii TruA kui ka RluA puudumisel (Tagel jt. 2016, Tagel, avaldamata). Käesoleva töö eesmärgid on püsitatud lähtuvalt hüpoteesist, et nähtud mutatsioonisageduse tõus on põhjustatud translatsiooni täpsuse langemisest nende ensüümide puudumisel. Kuna RluA puudumine ei mõjutanud uuritud kontekstides translatsiooni täpsust, siis see viitab, et mutatsioonisageduse tõus pseudouridiini süntaaside puudumisel pole põhjustatud translatsiooni täpsuse muutumisest.

Kokkuvõte

Translatsiooni täpsust on uuritud väga paljudes erinevates kontekstides, kuid valdavalt keskenduvad sellised uuringud ühele organismile. Translatsiooni täpsust erinevate organismide vahel on senini vähe võrreldud.

Käesoleva töö eesmärgiks oli leida testsüsteem, mis võimaldaks võrdlevalt iseloomustada translatsiooni täpsust bakterites *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas aeruginosa* ja *Escherichia coli* ning sellise testsüsteemi abil analüüsida Ψ -süntaaside TruA ja RluA puudumise mõju translatsiooni täpsusele. Tulemused näitasid, et:

1. Antud töös kasutatud topeltlutsiferaasi testsüsteem võimaldab neis bakterites translatsiooni täpsust mõõta.
2. Translatsioonivigade sageduse profiil on uuritud bakterites erinev.
3. TruA puudumisel suureneb translatsioonivigade sagedus teatud koodonkontekstides.
4. TruA mõju translatsiooni täpsusele *P. putida*-s on tingitud TruA katalüütilisest aktiivsusest.
5. RluA puudumine ei mõjuta translatsioonivigade sagedust.
6. Streptomütsiin suurendab translatsioonil stoppkoodoni UAG ülelugemist, kuid ei mõjuta raaminihke toimumist uuritud koodonkontekstis.

Käesolevas töös on esmakordselt võrreldud translatsiooni täpsust bakterites *P. putida*, *P. aeruginosa* ning *E. coli*. Translatsioonivigade esinemise profiil on neis bakterites erinev, mis näitab, kui kontekstist sõltuvad võivad olla pisinüansid translatsioonitäpsuse hoidmisel.

Summary

Accurate flow of genetic information from DNA all the way to proteins is essential to all cellular life. Because of the complexity of translational machinery, misincorporation of amino acids to the growing polypeptide chain still happens. This is tolerated by the cell to a certain extent, but accumulation of errors in the proteome can cause deleterious effects to the cell.

RNA plays a central role in translation: ribosome consists partly of rRNA and during translation codons on mRNA are decoded by tRNA-s. Post-transcriptional modifications are frequent constituents of RNA-s, the most common of which is pseudouridine (Ψ). The clustering of Ψ in functionally important regions in rRNA and tRNA points to functional importance, however, there is no clear consensus towards the actual function of Ψ . In our research group, two Ψ -synthases, TruA and RluA, have been previously shown to affect mutation frequency. TruA and RluA synthesize pseudouridines in the anticodon stem-loop and modifications in that region have been previously shown to affect the fidelity of translation. Therefore, it is possible that this is the connection between mutations and Ψ -synthases.

Different errors in translation have been measured and characterized, however, these studies have usually been done in a single organism. The aim for this study was to discover a suitable assay to measure translational fidelity in different bacterial species, namely *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli*, and how the translational fidelity is affected by the lack of TruA or RluA. The results of the work at hand can be summarized as follows:

1. Dual-luciferase assay is suitable for characterization of translational fidelity in different bacterial species.
2. The translational fidelity landscape varies between the investigated bacteria.
3. TruA affects translational fidelity in certain contexts, RluA does not.
4. The effect of TruA on translational fidelity is due to its catalytic activity.
5. Readthrough of UAG stopcodon is enhanced but translational frameshifting is unaffected by sublethal concentration of streptomycin in the investigated context.

The present work is the first to compare translational fidelity in *P. putida*, *P. aeruginosa* and *E. coli*. The variance of mistranslation between species shows how small nuances can have different effects on translational fidelity depending on codoncontext.

Tänuõnad

Soovin eelkõige tänada oma juhendajaid Mari ning Heilit, kes on aidanud mind nii laboris katsete tegemisel kui ka andnud põhjalikku ning kasulikku tagasisidet minu töö kohta. Samuti soovin tänada Jaanus Remmet, kes aitas mul paremini mõista tRNA hingeelu ning kelle laborist saime lahke kingitusena algsed testsüsteemide plasmiidid. Suur aitäh ka kõigile geneetika õppetooli inimestele, kes pikki laboripäevi huvitavamaks muudavad.

Kasutatud kirjandus

- Addepalli, B. & P. A. Limbach (2016). "Pseudouridine in the anticodon of Escherichia coli tRNA^{Tyr} (QΨA) is catalyzed by the dual specificity enzyme RluF." Journal of Biological Chemistry **291**(42): 22327-22337.
- Agris, P. F., E. R. Eruysal, A. Narendran, V. Y. Väre, S. Vangaveti & S. V. Ranganathan (2018). "Celebrating wobble decoding: Half a century and still much is new." RNA biology **15**(4-5): 537-553.
- Alcaraz-Pérez, F., V. Mulero & M. L. Cayuela (2008). "Application of the dual-luciferase reporter assay to the analysis of promoter activity in Zebrafish embryos." BMC biotechnology **8**(1): 81.
- Bacher, J. M. & P. Schimmel (2007). "An editing-defective aminoacyl-tRNA synthetase is mutagenic in aging bacteria via the SOS response." Proceedings of the National Academy of Sciences **104**(6): 1907-1912.
- Bakin, A., J. A. Kowalak, J. A. McCloskey & J. Ofengand (1994). "The single pseudouridine residue in Escherichia coli 16S RNA is located at position 516." Nucleic acids research **22**(18): 3681-3684.
- Baranov, P. V., R. F. Gesteland & J. F. Atkins (2004). "P-site tRNA is a crucial initiator of ribosomal frameshifting." Rna **10**(2): 221-230.
- Bayley, S. A., C. J. Duggleby, M. J. Worsey, P. A. Williams, K. G. Hardy & P. Broda (1977). "Two modes of loss of the Tol function from Pseudomonas putida mt-2." Molecular and General Genetics MGG **154**(2): 203-204.
- Berry, M. J. & P. R. Larsen (1993). Recognition of UGA as a selenocysteine codon in eukaryotes: a review of recent progress, Portland Press Limited.
- Bertram, G., S. Innes, O. Minella, J. P. Richardson & I. Stansfield (2001). "Endless possibilities: translation termination and stop codon recognition." Microbiology **147**(2): 255-269.
- Blattner, F. R., G. Plunkett, C. A. Bloch, N. T. Perna, V. Burland, M. Riley, J. Collado-Vides, J. D. Glasner, C. K. Rode & G. F. Mayhew (1997). "The complete genome sequence of Escherichia coli K-12." science **277**(5331): 1453-1462.
- Boccaletto, P., M. A. Machnicka, E. Purta, P. Piątkowski, B. Bagiński, T. K. Wirecki, V. de Crécy-Lagard, R. Ross, P. A. Limbach & A. Kotter (2017). "MODOMICS: a database of RNA modification pathways. 2017 update." Nucleic acids research **46**(D1): D303-D307.
- Brimacombe, R., P. Mitchell, M. Osswald, K. Stade & D. Bochkariov (1993). "Clustering of modified nucleotides at the functional center of bacterial ribosomal RNA." The FASEB Journal **7**(1): 161-167.
- Bullwinkle, T. J., N. M. Reynolds, M. Raina, A. Moghal, E. Matsa, A. Rajkovic, H. Kayadibi, F. Fazlollahi, C. Ryan & N. Howitz (2014). "Oxidation of cellular amino acid pools leads to cytotoxic mistranslation of the genetic code." Elife **3**: e02501.
- Caliskan, N., I. Wohlgemuth, N. Korniy, M. Pearson, F. Peske & M. V. Rodnina (2017). "Conditional switch between frameshifting regimes upon translation of dnaX mRNA." Molecular cell **66**(4): 558-567. e554.
- Chan, P. P. & T. M. Lowe (2015). "GtRNAdb 2.0: an expanded database of transfer RNA genes identified in complete and draft genomes." Nucleic acids research **44**(D1): D184-D189.
- Charette, M. & M. W. Gray (2000). "Pseudouridine in RNA: what, where, how, and why." IUBMB life **49**(5): 341-351.

- Czudnochowski, N., A. L. Wang, J. Finer-Moore & R. M. Stroud (2013). "In human pseudouridine synthase 1 (hPus1), a C-terminal helical insert blocks tRNA from binding in the same orientation as in the Pus1 bacterial homologue TruA, consistent with their different target selectivities." Journal of molecular biology **425**(20): 3875-3887.
- Das, M., O. Vargas-Rodriguez, Y. Goto, H. Suga & K. Musier-Forsyth (2013). "Distinct tRNA recognition strategies used by a homologous family of editing domains prevent mistranslation." Nucleic acids research **42**(6): 3943-3953.
- Demeshkina, N., L. Jenner, E. Westhof, M. Yusupov & G. Yusupova (2012). "A new understanding of the decoding principle on the ribosome." Nature **484**(7393): 256.
- Devaraj, A., S. Shoji, E. D. Holbrook & K. Fredrick (2009). "A role for the 30S subunit E site in maintenance of the translational reading frame." Rna **15**(2): 255-265.
- Dong, X., Y. Bessho, R. Shibata, M. Nishimoto, M. Shirouzu, S. Kuramitsu & S. Yokoyama (2006). "Crystal Structure of the tRNA Pseudouridine Synthase TruA from *Thermus Thermophilus* HB8." RNA biology **3**(3): 115-121.
- Ellis, N. & J. Gallant (1982). "An estimate of the global error frequency in translation." Molecular and General Genetics MGG **188**(2): 169-172.
- Engelberg-Kulka, H. (1981). "UGA suppression by normal tRNA^{Trp} in *Escherichia coli*: codon context effects." Nucleic acids research **9**(4): 983-991.
- Farabaugh, P. J. (1996). "Programmed translational frameshifting." Annual review of genetics **30**(1): 507-528.
- Farabaugh, P. J. (2000). "Translational frameshifting: implications for the mechanism of translational frame maintenance." Progress in nucleic acid research and molecular biology **64**: 131-170.
- Fersht, A. R. & C. Dingwall (1979). "Cysteinyl-tRNA synthetase from *Escherichia coli* does not need an editing mechanism to reject serine and alanine. High binding energy of small groups in specific molecular interactions." Biochemistry **18**(7): 1245-1249.
- Foster, P. G., L. Huang, D. V. Santi & R. M. Stroud (2000). "The structural basis for tRNA recognition and pseudouridine formation by pseudouridine synthase I." Nature structural & molecular biology **7**(1): 23.
- Gao, X., Q. Ma & H. Zhu (2015). "Distribution, industrial applications, and enzymatic synthesis of D-amino acids." Applied microbiology and biotechnology **99**(8): 3341-3349.
- Garofalo, R., I. Wohlgemuth, M. Pearson, C. Lenz, H. Urlaub & M. V. Rodnina (2019). "Broad range of missense error frequencies in cellular proteins." Nucleic acids research.
- Gomes, A. C., A. J. Kordala, R. Strack, X. Wang, R. Geslain, K. Delaney, W. C. Clark, R. Keenan & T. Pan (2016). "A dual fluorescent reporter for the investigation of methionine mistranslation in live cells." Rna **22**(3): 467-476.
- Grentzmann, G., J. A. Ingram, P. J. Kelly, R. F. Gestaland & J. F. Atkins (1998). "A dual-luciferase reporter system for studying recoding signals." Rna **4**(4): 479-486.
- Gu, C., T. J. Begley & P. C. Dedon (2014). "tRNA modifications regulate translation during cellular stress." FEBS letters **588**(23): 4287-4296.
- Gu, X., M. Yu, K. M. Ivanetich & D. V. Santi (1998). "Molecular recognition of tRNA by tRNA pseudouridine 55 synthase." Biochemistry **37**(1): 339-343.

- Guo, M., Y. E. Chong, R. Shapiro, K. Beebe, X.-L. Yang & P. Schimmel (2009). "Paradox of mistranslation of serine for alanine caused by AlaRS recognition dilemma." Nature **462**(7274): 808.
- Gutgsell, N., N. Englund, L. Niu, Y. Kaya, B. G. Lane & J. Ofengand (2000). "Deletion of the *Escherichia coli* pseudouridine synthase gene *truB* blocks formation of pseudouridine 55 in tRNA in vivo, does not affect exponential growth, but confers a strong selective disadvantage in competition with wild-type cells." Rna **6**(12): 1870-1881.
- Hamma, T. & A. R. Ferré-D'Amaré (2006). "Pseudouridine synthases." Chemistry & biology **13**(11): 1125-1135.
- Harger, J. W. & J. D. Dinman (2003). "An in vivo dual-luciferase assay system for studying translational recoding in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*." Rna **9**(8): 1019-1024.
- Harrington, K. M., I. A. Nazarenko, D. B. Dix, R. C. Thompson & O. C. Uhlenbeck (1993). "In vitro analysis of translational rate and accuracy with an unmodified tRNA." Biochemistry **32**(30): 7617-7622.
- Hoang, C., J. Chen, C. A. Vizthum, J. M. Kandel, C. S. Hamilton, E. G. Mueller & A. R. Ferré-D'Amaré (2006). "Crystal structure of pseudouridine synthase RluA: indirect sequence readout through protein-induced RNA structure." Molecular cell **24**(4): 535-545.
- Hur, S. & R. M. Stroud (2007). "How U38, 39, and 40 of many tRNAs become the targets for pseudouridylation by TruA." Molecular cell **26**(2): 189-203.
- Imashimizu, M., T. Oshima, L. Lubkowska & M. Kashlev (2013). "Direct assessment of transcription fidelity by high-resolution RNA sequencing." Nucleic acids research **41**(19): 9090-9104.
- Jacks, T., H. D. Madhani, F. R. Masiarz & H. E. Varmus (1988). "Signals for ribosomal frameshifting in the Rous sarcoma virus gag-pol region." Cell **55**(3): 447-458.
- Jakubowski, H. (1990). "Proofreading in vivo: editing of homocysteine by methionyl-tRNA synthetase in *Escherichia coli*." Proceedings of the National Academy of Sciences **87**(12): 4504-4508.
- Jakubowski, H. (1999). "Misacylation of tRNA^{Lys} with noncognate amino acids by lysyl-tRNA synthetase." Biochemistry **38**(25): 8088-8093.
- Johansson, M., J. Zhang & M. Ehrenberg (2012). "Genetic code translation displays a linear trade-off between efficiency and accuracy of tRNA selection." Proceedings of the National Academy of Sciences **109**(1): 131-136.
- Kammen, H. O., C. C. Marvel, L. Hardy & E. E. Penhoet (1988). "Purification, structure, and properties of *Escherichia coli* tRNA pseudouridine synthase I." Journal of Biological Chemistry **263**(5): 2255-2263.
- Khaitovich, P., T. Tenson, P. Kloss & A. S. Mankin (1999). "Reconstitution of functionally active *Thermus aquaticus* large ribosomal subunits with in vitro-transcribed rRNA." Biochemistry **38**(6): 1780-1788.
- Kirchner, S. & Z. Ignatova (2015). "Emerging roles of tRNA in adaptive translation, signalling dynamics and disease." Nature Reviews Genetics **16**(2): 98.
- Kramer, E. B. & P. J. Farabaugh (2007). "The frequency of translational misreading errors in *E. coli* is largely determined by tRNA competition." Rna **13**(1): 87-96.
- Kunkel, T. A. (2004). "DNA replication fidelity." Journal of Biological Chemistry **279**(17): 16895-16898.

- Kurland, C. (1992). "Translational accuracy and the fitness of bacteria." Annual review of genetics **26**(1): 29-50.
- Larsen, B., R. F. Gesteland & J. F. Atkins (1997). "Structural probing and mutagenic analysis of the stem-loop required for Escherichia coli dnaX ribosomal frameshifting: programmed efficiency of 50%." Journal of molecular biology **271**(1): 47-60.
- Lecointe, F., O. Namy, I. Hatin, G. Simos, J.-P. Rousset & H. Grosjean (2002). "Lack of pseudouridine 38/39 in the anticodon arm of yeast cytoplasmic tRNA decreases in vivo recoding efficiency." Journal of Biological Chemistry **277**(34): 30445-30453.
- Lecointe, F., G. Simos, A. Sauer, E. C. Hurt, Y. Motorin & H. Grosjean (1998). "Characterization of yeast protein Deg1 as pseudouridine synthase (Pus3) catalyzing the formation of Ψ38 and Ψ39 in tRNA anticodon loop." Journal of Biological Chemistry **273**(3): 1316-1323.
- Lee, J. W., K. Beebe, L. A. Nangle, J. Jang, C. M. Longo-Guess, S. A. Cook, M. T. Davisson, J. P. Sundberg, P. Schimmel & S. L. Ackerman (2006). "Editing-defective tRNA synthetase causes protein misfolding and neurodegeneration." Nature **443**(7107): 50.
- Lee, J. Y., D. G. Kim, B.-G. Kim, W. S. Yang, J. Hong, T. Kang, Y. S. Oh, K. R. Kim, B. W. Han & B. J. Hwang (2014). "Promiscuous methionyl-tRNA synthetase mediates adaptive mistranslation to protect cells against oxidative stress." J Cell Sci **127**(19): 4234-4245.
- Lewis, C. J., T. Pan & A. Kalsotra (2017). "RNA modifications and structures cooperate to guide RNA-protein interactions." Nature reviews Molecular cell biology **18**(3): 202.
- Li, J.-n., B. Esberg, J. F. Curran & G. R. Björk (1997). "Three modified nucleosides present in the anticodon stem and loop influence the in vivo aa-tRNA selection in a tRNA-dependent manner." Journal of molecular biology **271**(2): 209-221.
- Lilleorg, S., K. Reier, J. Remme & A. Liiv (2017). "The intersubunit bridge B1b of the bacterial ribosome facilitates initiation of protein synthesis and maintenance of translational fidelity." Journal of molecular biology **429**(7): 1067-1080.
- Lvovs, A. (2017). "*Pseudomonas putida* pseudouridiini süntaas RluA." Bakalaureusetöö, Tartu Ülikool.
- Martin, R., A. E. Mogg, L. A. Heywood, L. Nitschke & J. F. Burke (1989). "Aminoglycoside suppression at UAG, UAA and UGA codons in Escherichia coli and human tissue culture cells." Molecular and General Genetics MGG **217**(2-3): 411-418.
- Martinis, S. A. & M. T. Boniecki (2010). "The balance between pre-and post-transfer editing in tRNA synthetases." FEBS letters **584**(2): 455-459.
- Massenet, S., Y. Motorin, D. L. Lafontaine, E. C. Hurt, H. Grosjean & C. Branlant (1999). "Pseudouridine mapping in the Saccharomyces cerevisiae spliceosomal U small nuclear RNAs (snRNAs) reveals that pseudouridine synthase pus1p exhibits a dual substrate specificity for U2 snRNA and tRNA." Molecular and cellular biology **19**(3): 2142-2154.
- Meyerovich, M., G. Mamou & S. Ben-Yehuda (2010). "Visualizing high error levels during gene expression in living bacterial cells." Proceedings of the National Academy of Sciences **107**(25): 11543-11548.
- Miller, J. (1972). Assay of B-galactosidase In: Experiments in molecular genetics, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Mohler, K. & M. Ibba (2017). "Translational fidelity and mistranslation in the cellular response to stress." Nature microbiology **2**(9): 17117.

- Nilsson, M. & M. Rydén-Aulin (2003). "Glutamine is incorporated at the nonsense codons UAG and UAA in a suppressor-free *Escherichia coli* strain." Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Structure and Expression **1627**(1): 1-6.
- Nurse, K., J. Wrzesinski, A. Bakin, B. G. Lane & J. Ofengand (1995). "Purification, cloning, and properties of the tRNA psi 55 synthase from *Escherichia coli*." Rna **1**(1): 102.
- O'Connor, M. & A. E. Dahlberg (1993). "Mutations at U2555, a tRNA-protected base in 23S rRNA, affect translational fidelity." Proceedings of the National Academy of Sciences **90**(19): 9214-9218.
- O'Connor, M., H. U. Göringer & A. E. Dahlberg (1992). "A ribosomal ambiguity mutation in the 530 loop of *E. coli* 16S rRNA." Nucleic acids research **20**(16): 4221-4227.
- O'Connor, M., M. Leppik & J. Remme (2018). "Pseudouridine-free *Escherichia coli* ribosomes." Journal of bacteriology **200**(4): e00540-00517.
- Obranić, S., F. Babić & G. Maravić-Vlahoviček (2013). "Improvement of pBBR1MCS plasmids, a very useful series of broad-host-range cloning vectors." Plasmid **70**(2): 263-267.
- Ofengand, J. & A. Bakin (1997). "Mapping to nucleotide resolution of pseudouridine residues in large subunit ribosomal RNAs from representative eukaryotes, prokaryotes, archaeobacteria, mitochondria and chloroplasts." Journal of molecular biology **266**(2): 246-268.
- Ou, X., J. Cao, A. Cheng, M. P. Peppelenbosch & Q. Pan (2019). "Errors in translational decoding: tRNA wobbling or misincorporation?" PLoS genetics **15**(3): e1008017.
- Palmer, D. T., P. H. Blum & S. W. Artz (1983). "Effects of the hisT mutation of *Salmonella typhimurium* on translation elongation rate." Journal of bacteriology **153**(1): 357-363.
- Pang, Y. L. J., K. Poruri & S. A. Martinis (2014). "tRNA synthetase: tRNA aminoacylation and beyond." Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA **5**(4): 461-480.
- Petrullo, L. A., P. J. Gallagher & D. Elseviers (1983). "The role of 2-methylthio-N⁶-isopentenyladenosine in readthrough and suppression of nonsense codons in *Escherichia coli*." Molecular and General Genetics MGG **190**(2): 289-294.
- Ramakrishnan, V. (2002). "Ribosome structure and the mechanism of translation." Cell **108**(4): 557-572.
- Raychaudhuri, S., L. Niu, J. Conrad, B. G. Lane & J. Ofengand (1999). "Functional Effect of Deletion and Mutation of the *Escherichia coli* Ribosomal RNA and tRNA Pseudouridine Synthase RluA." Journal of Biological Chemistry **274**(27): 18880-18886.
- Reynolds, N. M., B. A. Lazazzera & M. Ibba (2010). "Cellular mechanisms that control mistranslation." Nature Reviews Microbiology **8**(12): 849.
- Ruusala, T. & C. Kurland (1984). "Streptomycin preferentially perturbs ribosomal proofreading." Molecular and General Genetics MGG **198**(1): 100-104.
- Schwartz, M. H., J. R. Waldbauer, L. Zhang & T. Pan (2016). "Global tRNA misacylation induced by anaerobiosis and antibiotic exposure broadly increases stress resistance in *Escherichia coli*." Nucleic acids research **44**(21): 10292-10303.
- Shehu-Xhilaga, M., S. M. Crowe & J. Mak (2001). "Maintenance of the Gag/Gag-Pol ratio is important for human immunodeficiency virus type 1 RNA dimerization and viral infectivity." Journal of virology **75**(4): 1834-1841.
- Zhao, J., H.-C. E. Leung & M. E. Winkler (2001). "The miaA Mutator Phenotype of *Escherichia coli* K-12 Requires Recombination Functions." Journal of bacteriology **183**(5): 1796-1800.

Tagel, M., K. Tavita, R. Hõrak, M. Kivisaar & H. Ilves (2016). "A novel papillation assay for the identification of genes affecting mutation rate in *Pseudomonas putida* and other pseudomonads." Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis **790**: 41-55.

Tsuchihashi, Z. (1991). "Translational frame shifting in the *Escherichia coli* dnaX gene in vitro." Nucleic acids research **19**(9): 2457-2462.

Urbonavičius, J., Q. Qian, J. M. Durand, T. G. Hagervall & G. R. Björk (2001). "Improvement of reading frame maintenance is a common function for several tRNA modifications." The EMBO journal **20**(17): 4863-4873.

Vacher, J., H. Grosjean, C. Houssier & R. H. Buckingham (1984). "The effect of point mutations affecting *Escherichia coli* tryptophan tRNA on anticodon-anticodon interactions and on UGA suppression." Journal of molecular biology **177**(2): 329-342.

Weiss, R., D. Dunn, J. Atkins & R. Gesteland (1987). Slippery runs, shifty stops, backward steps, and forward hops: -2, -1, +1, +2, +5, and +6 ribosomal frameshifting. Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology, Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Wrzesinski, J., A. Bakin, K. Nurse, B. G. Lane & J. Ofengand (1995). "Purification, cloning, and properties of the 16S RNA pseudouridine 516 synthase from *Escherichia coli*." Biochemistry **34**(27): 8904-8913.

Wrzesinski, J., K. Nurse, A. Bakin, B. Lane & J. Ofengand (1995). "A dual-specificity pseudouridine synthase: an *Escherichia coli* synthase purified and cloned on the basis of its specificity for psi 746 in 23S RNA is also specific for psi 32 in tRNA (phe)." Rna **1**(4): 437-448.

Yi, C. & T. Pan (2011). "Cellular dynamics of RNA modification." Accounts of chemical research **44**(12): 1380-1388.

Kasutatud veebilehed

www.pseudomonas.com

www.ncbi.nlm.nih.gov

modomics.genesilico.pl

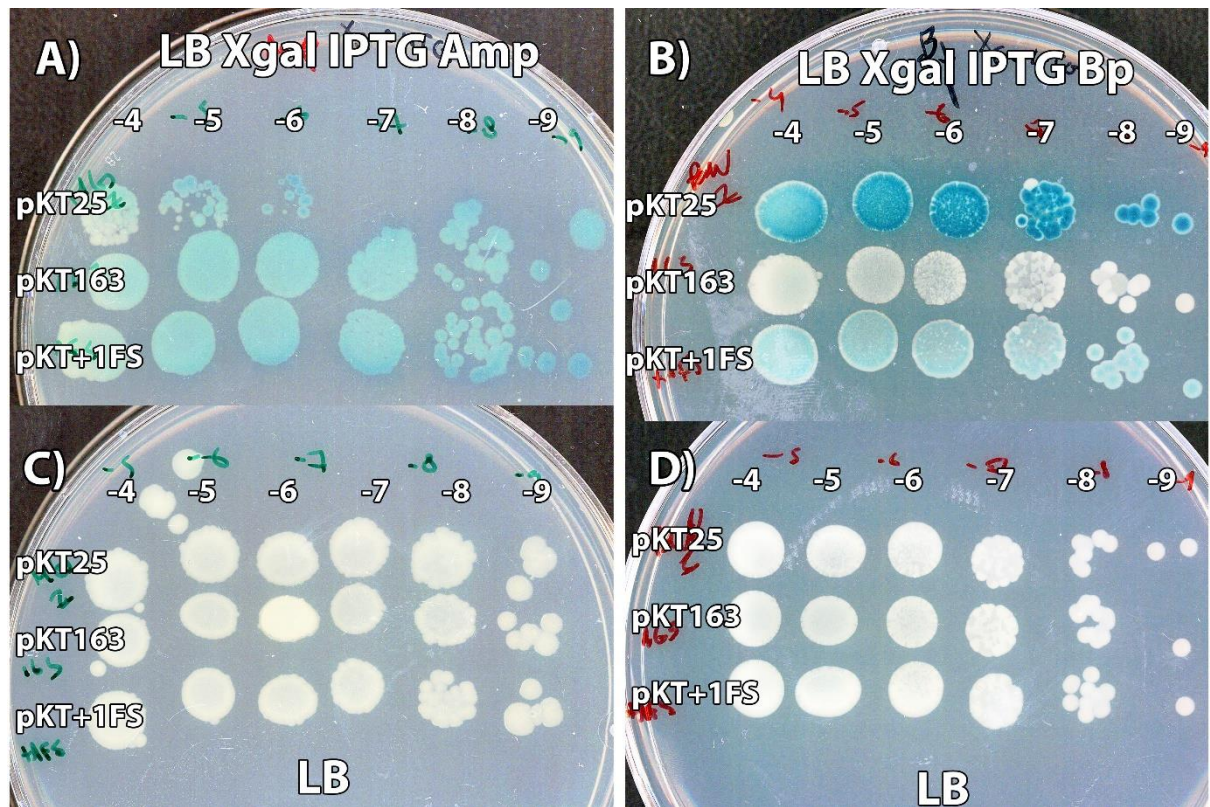
Lisad

Lisa 1. Töös kasutatud bakteritüved ning plasmiidid

Bakteritüvi	Iseloomustus	Allikas
<i>Pseudomonas putida</i>		
PaW85	Algne tüvi, isogeenne täielikult sekveneeritud <i>P. putida</i> KT2440 tüvega	(Bayley jt., 1977)
PaW85 Δ truA	PaW85 tüvest geeni <i>truA</i> täisdeletsioon	(Tagel jt., 2016)
PaW85 Δ rluA	PaW85 tüvest geeni <i>rluA</i> täisdeletsioon	(Lvovs, 2017)
PaW85 Δ truA-tactruA	PaW85 Δ truA tüvi, mis sisaldab kromosoomis <i>glmS</i> geeni järel geenikasseti <i>lacI-P_{tac}-truA</i> , (Gm ^r)	(Tagel, avaldamata)
PaW85 Δ truA-muttruA	PaW85 Δ truA tüvi, mis sisaldab kromosoomis <i>glmS</i> geeni järel geenikasseti <i>lacI-P_{tac}-muttruA</i> , (Gm ^r) <i>muttruA</i> – kodeerib katalüütiliselt mitte-funktsionaalset TruA-d (70. positsioonis olev asparagiinhape on asendatudalaniiniga)	(Tagel, avaldamata)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		
PAO1	Algne tüvi	<i>Pseudomonas</i> Genetic Stock Centre
PAO1 Δ truA	PAO1 tüvest geeni <i>truA</i> täisdeletsioon	(Tagel, avaldamata)
PAO1 Δ rluA	PAO1 tüvest geeni <i>rluA</i> täisdeletsioon	(Tagel, avaldamata)

<i>Escherichia coli</i>		
MG1655	F ⁻ <i>ilvG- rfb-50 rph-1</i>	(Blattner jt., 1997)
MG1655 Δ truA	MG1655 tüvest geeni <i>truA</i> deletsioon	(Tagel, avaldamata)
MG1655 Δ rluA	MG1655 tüvest geeni <i>rluA</i> deletsioon	(Tagel, avaldamata)
Plasmiidid		
pKT25	pSG25 plasmiidist pärinev <i>lacZ</i> geen plasmiidis pKT2440 (Amp ^R)	Heili Ilves
pKT163	pKT25 derivaat, funktsionaalse valgu (β -galaktosidaas) süntees nõuab UAG stoppkoodoni ülelugemist <i>lacZ</i> 11. koodonpositsioonis	Heili Ilves
pKT3/4	pKT25 derivaat, funktsionaalse valgu (β -galaktosidaas) süntees nõuab UGA stoppkoodoni ülelugemist <i>lacZ</i> 11. koodonpositsioonis	Heili Ilves
pKT+1FS	pKT25 derivaat, funktsionaalse valgu (β -galaktosidaas) süntees nõuab +1 raaminihet (<i>lacZ</i> 7. koodoni järel on lisa U nukleotiid)	Heili Ilves
pKT -1FS	pKT25 derivaat, funktsionaalse valgu (β -galaktosidaas) süntees nõuab -1 raaminihet (<i>lacZ</i> 10. koodonis A nukleotiidi deletsioon)	Heili Ilves
pSEVA lacI-tac RF	<i>tac</i> -promootori all olevat mutatsioonideta topeltlutsiferaasi testsüsteemi sisaldav plasmiid, sisaldab ka Km ^r (resistentsusgeeni)	Mari Tagel

pSEVA AD2	pSEVA lacI-tac RF derivaat, funktsionaalse Fluc tootmine nõuab <i>linker</i> -rergioonis -1 raaminihet	Mari Tagel
pSEVA AD5	pSEVA lacI-tac RF derivaat, funktsionaalse Fluc tootmine nõuab <i>linker</i> -rergioonis +1 raaminihet	Mari Tagel
pSEVA AD7	pSEVA lacI-tac RF derivaat, funktsionaalse Fluc tootmine nõuab <i>linker</i> -rergioonis -1 raaminihet	Mari Tagel
pSEVA 304	pSEVA lacI-tac RF derivaat, funktsionaalse Fluc tootmine nõuab UAG stoppkoodoni ülelugemist positsioonis 304	Mari Tagel
pSEVA 417	pSEVA lacI-tac RF derivaat, funktsionaalse Fluc tootmine nõuab UGA stoppkoodoni ülelugemist positsioonis 417	Mari Tagel
pBBR1 MCS5	Matriitsiks Gm ^r ülesamplifitseerimisel	(Obranić jt., 2013)
pSEVA AD2 Gm	pSEVA AD2 derivaat, lisatud Gm ^r	Heili Ilves
pSEVA AD5 Gm	pSEVA AD5 derivaat, lisatud Gm ^r	Heili Ilves
pSEVA AD7 Gm	pSEVA AD7 derivaat, lisatud Gm ^r	Heili Ilves
pSEVA 304 Gm	pSEVA 304 derivaat, lisatud Gm ^r	Heili Ilves
pSEVA 417 Gm	pSEVA 417 derivaat, lisatud Gm ^r	Käesolev töö



Lisa 2. *lacZ* testsüsteemiga plasmidi stabiilsuse kontroll *E. coli* (paneelid A ja C) ning *P. putida* (paneelid B ja D) rakkudes. *Wt lacZ* testsüsteemiga (pKT25) *E. coli* rakkude elumus on selektiivse antibiootikumiga tardsöötmele vähenenud (paneel A) võrreldes mutatsioonidega vektoritega (pKT163 ja pKT+1FS). Samadest vedelkultuuridest antibiootikumita söötmele tilgutatud rakukultuurides ei ole arvukuses erinevusi vektorite vahel. *E. coli*-s nähtud efekt ei esine *P. putida*-s (paneelil B antibiootikumiga tardsööde ning paneelil D antibiootikumita). *P. aeruginosa* tulemused pole näidatud.

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Karl Jürgenstein,

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) minu loodud teose

„Translatsiooni täpsus tRNA antikoodonlingu Ψ 32 ja Ψ 38-40 puudumisel“,

mille juhendajad on Mari Tagel, MSc ja Heili Ilves PhD,

reprodutseerimiseks eesmärgiga seda säilitada, sealhulgas lisada digitaalarhiivi DSpace kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.

2. Annan Tartu Ülikoolile loa teha punktis 1 nimetatud teos üldsusele kättesaadavaks Tartu Ülikooli veebikeskkonna, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace kaudu Creative Commons'i litsentsiga CC BY NC ND 3.0, mis lubab autorile viidates teost reprodutseerida, levitada ja üldsusele suunata ning keelab luua tuletatud teost ja kasutada teost ärieesmärgil, kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.

3. Olen teadlik, et punktides 1 ja 2 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.

4. Kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei riku ma teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse õigusaktidest tulenevaid õigusi.

Karl Jürgenstein
30.05.2019